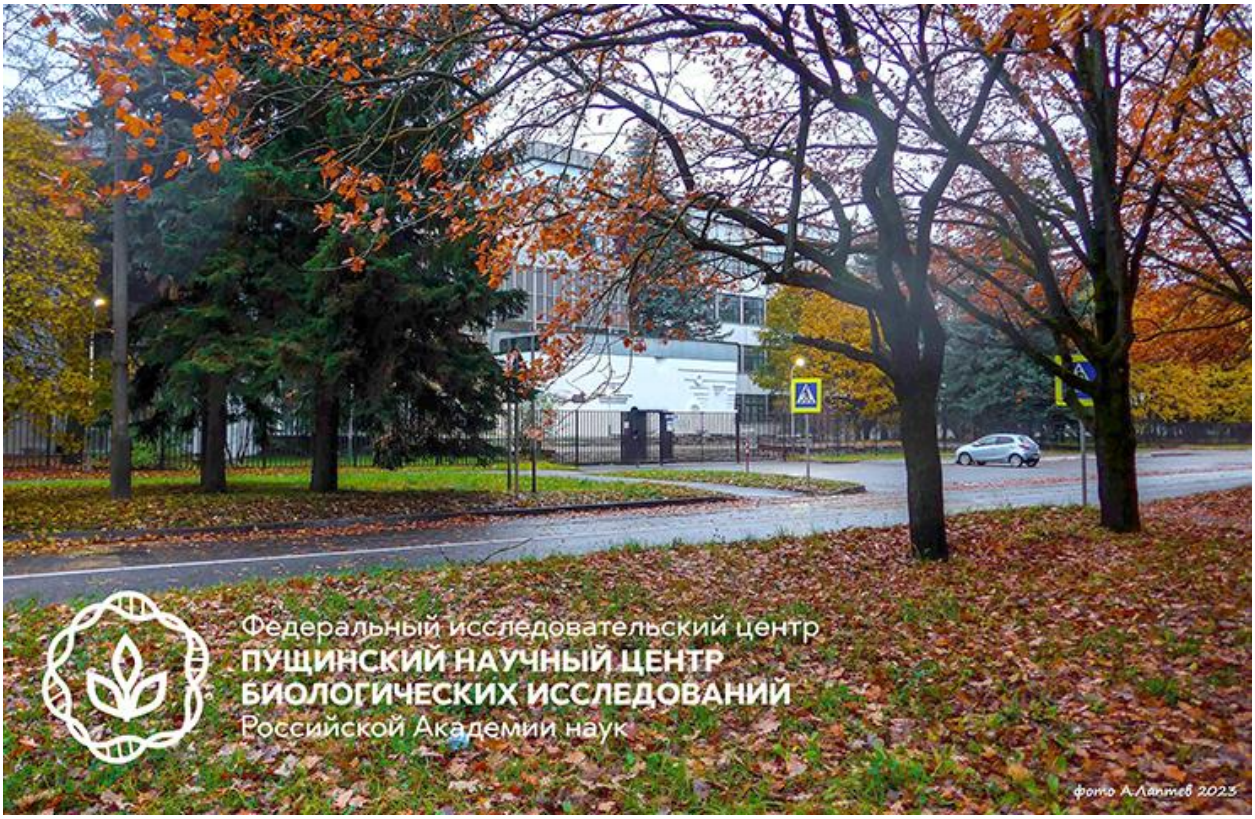
ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрябина РАН

XI Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»

К 60-летию образования Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

Сборник материалов конференции

г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г.



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

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

К 60-летию образования Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

Сборник материалов конференции

г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г.

Электронное текстовое издание

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2025

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН, 2025
ISBN 978-5-00271-052-2

УДК 579.2(082)
ББК 28.4я43
В85

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

Тезисы докладов одобрены программным комитетом
и издаются в авторской редакции

В85 **XI Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»** [Электронный ресурс]: сборник материалов конференции; г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г. / под ред. Т. А. Решетиловой. – СПб.: Наукоемкие технологии, 2025. – 181 с. – URL: https://publishing.intelgr.com/archive/Biokhimiya-fiziologiya-i-biosfernaya-rol-mikroorganizmov.pdf.

ISBN 978-5-00271-052-2

Сборник включает расширенные тезисы устных и постерных сообщений ведущих специалистов-микробиологов, молекулярных биологов, генетиков, биотехнологов и начинающих исследователей по материалам работ, выполненных в научных учреждениях и университетах страны.

Материалы сообщений охватывают широкий спектр направлений исследований современной микробиологии – стремительно развивающейся области науки, неразрывно связанной с развитием и использованием генетических технологий и методов биоинформатики. В сборнике представлены результаты исследований микробного разнообразия на разных уровнях (организменном, структурном, геномном, функциональном) и методы его сохранения в коллекциях культур, обсуждаются тенденции развития систематики микроорганизмов в постгеномную эру, актуальные вопросы экологии и эволюции различных групп микроорганизмов, а также новые методы исследований и биотехнологические разработки. Результаты представленных работ являются неотъемлемой частью реализации стратегического плана развития природоподобных технологий в России, включающего исследования и разработки для биотехнологий и биоэкономики.

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

© ФИЦ Пущинский научный центр
биологических исследований РАН, 2025

ISBN 978-5-00271-052-2

Научное издание

XI Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»

Сборник материалов конференции

г. Пущино, 2–4 декабря 2025 г.

Электронное текстовое издание

Подписано к использованию 28.11.2025.
Объем издания – 6,2 Мб.

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
https://publishing.intelgr.com
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63
Интернет-магазин издательства
https://shop.intelgr.com/

ISBN 978-5-00271-052-2

Содержание

СЕКЦИЯ 1
Микробное разнообразие и экология микроорганизмов

Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.
Геномный анализ Ln^{3+}-зависимой метилотрофии у нового представителя рода *Jiella* 11

Анисимова Л.Г.
Оценка бактериального разнообразия компоста пищевых отходов растительного и животного происхождения 13

Барабошкина А.В., Кужамбердиева С., Нарманова Р.А., Аппазов Н.О., Делеган Я.А., Кочаровская Ю.Н., Богун А.Г., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Ветрова А.А., Сулейменов Н., Ниязова Д., Еспанова И., Канжар С., Алимхан Б., Филонов А.Е.
Таксономическое разнообразие и биодеградативный потенциал микробного сообщества сероземной почвы полигона «Даулет Азия» (Южный Казахстан) при нефтяном загрязнении ... 15

Бузиков Р.М., Шадрин А.М.
Вирулентные бактериофаги энтерококков 17

Ветрова А.А., Иванова А.А., Сазонова О.И.
Структурно-функциональное разнообразие грибных сообществ атмосферной пыли: современные подходы метабаркодинга и экосистемная значимость 19

Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.
Характеристика нового термотолерантного факультативного метилотрофа *Mycolicibacterium mageritense* Myc9 20

Козека О. Ю. Егорова А. В.
Содержание нитчатых микроорганизмов в активном иле промышленных аэротенков..... 21

Коренкова А.К., Захарюк А.Г., Кочаровская Ю.Н., Волкова Е.М., *Щербакова В.А.*
Распространение бактерий в торфах болот Тульской области 23

Косенко Н.Р., Лысак Л.В.
Численность и филогенетическое разнообразие прокариотных сообществ почвоподобных тел пещер Вьетнама 25

Крылов К. И., Паринова Т. С., Дёмин К. А.
Поиск новых регуляторов сульфитредуктазы у сульфатредукторов филума Chloroflexota и анализ их потенциальных экологических ниш 26

Никифорова А.А., Лутфуллин М.Т., Лутфуллина Г.Ф.
Выделение, идентификация и характеристика антагонистической активности бактерий, выделенных из эндосферы разных сортов картофеля 28

Пильгуй Л.С., Калинин Д.С., Шляпников М.Г., Земскова М.Ю., Грановский И.Э.
Репродукция вируса АЧС в клетках свиньи, экспрессирующих химерную прокаспазу -3 с сайтом протеазы Ps273R вируса АЧС 30

Поливцева В.Н., Абашина Т.Н., Звонарёв А.Н., Носков А.Е., Мачулин А.В., Перов Я.А., Шорохова А.П., Сузина Н.Е.
Свойства нового изолята грамположительной ультрамикробактерии, шт. SLS-3, выделенной из песка прибрежной океанической зоны в Шри-Ланке 32

Сазонова О.И., Иванова А.А., Ветрова А.А.
Климатические и антропогенные факторы формирования городского аэробиома: сравнительный анализ бактерий и металлов в PM10 Москвы, Мурманска и Рима 34

Хето М.Х., Ашихмина Т.Я.
Влияние доступа кислорода на микробиоту и запах навозных стоков 35

Холодова А.А., Герасимчук А.Л.
Чувствительность к антибиотикам непатогенных изолятов из сточных вод производства аквакультуры 37

СЕКЦИЯ 2
Биохимия, физиология и молекулярная биология микроорганизмов

Dzhuraeva M.M., Birkeland N.-K., Bobodzhanova Kh.I.
Metagenomic insights into the diversity of *Aquificaceae* from the Tamdykul geothermal spring, Tajikistan 39

Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.
Энергетические аспекты в ответе грибов и дрожжей на стрессовые воздействия 41

Баукова А.С., Ветрова А.А., Сузина Н.Е., Автух А.Н., Церфас М.О., Делеган Я.А.
Комплексная характеристика штамма *Pseudomonas* sp. VD9 – перспективного деструктора углеводородов, продуцирующего экзополисахаридную капсулу 43

Богданова Е.М., Пузанский Р.К., Сеник С.В., Котлова Е.Р.
Влияние дефицита фосфора на физиологическое состояние авто и миксотрофных культур *Chlamydomonas reinhardtii* 45

Брагин Е.Ю., Донова М.В.
Распространенность кластеров стероидного катаболизма среди прокариот 46

Бяков А.А., Торохов Т.Ю., Карпов М.В., Донова М.В.
Изменение активности ацетамидазного промотора в клетках *Mycolicibacterium smegmatis* в результате модификации оператора 48

Валиахметов А.Я.
Пентозофосфатный путь – основной регулятор развития SICD в дрожжах S.cerevisiae 50

Ветрова О.С., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Замятина А.В., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С.
Подавление гемолитической активности цитотоксина К2 и гемолизина II *Bacillus cereus* нейтрализующими моноклональными антителами, защита *in vivo* 52

Ветрова О.С., Руденко Н.В., Каратовская А.П., Замятина А.В., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С.
Разработка тест-системы в формате сэндвич-иммуноферментного анализа для выявления гемолизина II, секретируемого *Bacillus cereus* 54

Дмитриев В. В., Русакова Т. Г., Звонарев А.Н.
Экспорт белков у дрожжей при изменении условий культивирования 55

Жуланова Н.С., Тюленев А.В., Октябрьский О.Н.
Изменение уровней глутатиона у бактерий *Escherichia coli* в условиях азотного голодания 58

Земскова М.Ю., Пильгуй Л.С., Власова Н.Н., Калинин Д.С., Шляпников М.Г., Грановский И.Э.
Новая перевиваемая линия клеток селезёнки свиньи как модель для изучения репродукции вируса АЧС 59

Зимин А.А., Никулин Н.А., Дроздов А.Л., Никулина А.Н.
Обнаружение и филогенетический анализ гомологов PKD-доменов Hoc белка фага RB14 у белков скольжения по поверхности бета-протеобактерий рода *Janthinobacterium* 61

Зимин А.А., Рязанцев М.А., Дроздов А.Л., Сузина Н.Е.
Сравнительные исследования АТФ – зависимых ДНК – лигаз бактериофагов Т4, RB49 и ДНК-лигазы плазмиды морской бактерии Alteromonas mediterranea..... 63

Измалкова Т. Ю., Грановский И.Э., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А.
Устойчивость к тетрациклину: так ли всё просто с генами резистентности..... 65

Калашникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.
Влияние осмотического стресса на уровень глутатиона в клетках *Azotobacter vinelandii*..... 66

Кудрякова И.В., Афошин А.С., Иванков Д.Н., Булавко Е.С.,
Леонтьевская Е.А., Леонтьевская Н.В.
Специфичность действия перспективных для биомедицины бактериолитических ферментов Blp и Ami *Lysobacter capsici* XL1..... 68

Кудряшов Т.А., Трунилина М.В., Соколов А.С., Лаптева Ю.С.
Сравнительное исследование структурно-функциональных свойств метионин сульфоксимин ацетилтрансфераз бактерий *Thermus thermophilus* и *Salmonella enterica*..... 70

Кулаковская Е.В., Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Т.В.
Белки PHO-пути как участники адаптационных процессов у *Saccharomyces cerevisia* 71

Кульбаев И.С., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В.,Солонин А.С.
Выявление значимых участков последовательности оператора HlyIIR и поиск его потенциальных сайтов связывания в геноме *Bacillus cereus* ATCC 14579..... 73

Кхан Н.А., Трубицина Л.И., Леонтьевский А.А.
Клонирование, экспрессия и характеристика двухдоменной лакказы из актинобактерии *Kibdelosporangium aridum*..... 75

Лисов А.В., Трубицина Л.И., Белова О.В., Петракова М.П., Заварзина А.Г., Леонтьевский А.А.
Роль ферментов в стабилизации органического вещества почвы 76

Лосев Е.С., Панаит А.И., Погорелов А.А., Станкевич А.А.
Адгезия бактерий *Lactobacillus spp.* в водных растворах хлорида натрия с учетом эффекта осмоса/когезии..... 77

Манько К.С., Ренфельд Ж.В., Горина С.Ю., Черных А.М., Довбня Д.В.,
Донова М.В., Коломыцева М.П.
Скрининг микроорганизмов, способных окислять гидролизный лигнин сосны 79

Меденцев А.Г., Баскунов Б.П., Аринбасарова А.Ю.
о-Деметил-яваницин - внутриклеточный нафтохиноновый метаболит гриба *Fusarium decemcellulare* VKM F-1179..... 81

Микулинская Г.В., Чернышов С.В.
Пептидогликангидролаза из Gammaproteobacteria bacterium..... 83

Молчанова К.А., Нестерова Т.Б., Тучина Е.С., Нечаева О.В., Тучин В.В., Шнайдер Д.А.
Чувствительность дерматофитов рода Trichophyton к фотодинамическому действию фиолетового (405 нм) светодиодного излучения 85

Николаев Р.В., Чубукова О. В., Хакимова Л. Р., Лавина А.М., Аюпова Р.Г, Вершинина З. Р.
Исследование устойчивости к тяжелым металлам у почвенных бактерий *Pseudomonas* spp..... 87

Никулина А.Н., Зимин А.А., Сузина Н. Е., Никулин Н.А.
Разнообразие Т4-родственных колифагов со сниженной частотой трансдукции в сточных водах г. Пущино 89

Петров В.В.
Влияние мутации F728A в мембранном сегменте М6 на структурно-функциональную организацию H^+-АТФазы плазматической мембраны дрожжей..... 91

Позднякова-Филатова И.Ю., Фролова А.А., Трубицина Л.И.
Получение двухдоменной лакказы актинобактерии *Streptomyces carpinensis*в клетках *Rhodococcus qingshengii* X5 94

Ренфельд Ж.В., Фролов И.В., Черных А.М., Горина С.Ю., Коломыцева М.П.
Влияние вторичной координационной сферы железа на функциональные свойства катехол 1,2-диоксигеназы..... 95

Розова О.Н., Бут С.Ю., Шавкунов К.С., Мельников О.И., Шустова М.Н., Хмеленина В.Н., Мустахимов И.И.
Особенности метаболизма мутантного штамма *Methylotuvimicrobium alcaliphilum* 20Z-G с инактивированной глюкокиназой..... 97

Сазанова К.В., Родина О.А., Сеник С.В., Корнеев А.В., Зеленская М.С.
Растворение и минерализация фосфата цинка гопеита грибами..... 98

Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Шушкова Т.В., Тарлачков С.В., Леонтьевский А.А.
Биохимическая характеристика оксидоредуктаз аминофосфонатов почвенных бактерий рода *Achromobacter*..... 100

Сутормина Л.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.
Изменение содержания внутриклеточного цистеина у бактерий *Escherichia coli* при осмотическом стрессе..... 102

Томашевский А.А.
Активность и субстратная специфичность кислой фосфатазы Pho3p целых клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*..... 103

Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е., Екимова Г.А., Агафонова Н.В.
Роль дополнительного шаперонина GroEL при колонизации растений метилотрофом *Methylobacterium oryzae* CBMB20..... 104

Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.
Получение и характеристика мутантов *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 по генам LD-транспептидаз..... 106

Цой А.В., Белецкая А.В., Бойко М.И., Дёмин К.А.
Изучение микробного десульфонирования таурина почвенными актинобактериями..... 108

Шарабарина Т.В., Каневский М.В., Тучина Е.С.
Оценка формирования резистентности золотистого стафилококка к фиолетовому светодиодному (405 нм) излучению в ходе антимикробной фотодинамической терапии 110

Шестакова Е.К., Трубицина Л.И., Трубицин И.В., Петракова М.П., Леонтьевский А.А.
Получение и исследование свойств актинобактериальной лакказы из штамма *Streptomyces nodosus* ВКМ Ac-1224..... 112

СЕКЦИЯ 3

Ресурсный биотехнологический потенциал микробного разнообразия

Sabrinai Ismatullo, Dzhuraeva M.M., Birkeland N.-K., Bobodzhanova Kh.I.
Characterization of proteolytic, thermophilic bacteria isolated from geothermal springs in Tajikistan .. 113

Антипова Т.В., Желифонова В.П., Литовка Ю.А., Баскунов Б.П., Носков А.Е., Тимофеев А.А., Павлов И.Н.
Вторичные метаболиты фитопатогенных грибов *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, выделенных в Краснодарском крае и Абхазии..... 115

Антипова Т.В., Дубовик В.Р., Желифонова В.П., Лукина Е.Г., Баскунов Б.П., Маммери У.А., Смирнов С.Н., Иванушкина Н.Е., Зайцев К.В., Венг Ц., Берестецкий А.О.
Фуроизокумарины гриба *Aspergillus calidoustus* ВКМ F-4916 и оценка их пестицидной активности..... 117

Антипова Т.В., Желифонова В.П., Дубовик В.Р., Лукина Е.Г., Ху Ц., Кочкина Г.А., Берестецкий А.О.
Метаболический потенциал грибов *Pseudogymnoascus* spp. 119

Боков Н.А. Широких И.Г.
Гидролитические свойства актиномицета из водорослевой пленки с поверхности скального обнажения известняков..... 121

Дрокина У.Д.
Влияние предпосевной инокуляции семян *Bacillus thuringiensis* на всхожесть и ростовые параметры сельскохозяйственных культур 123

Есикова Т.З.
Характеристика нового штамма-деструктора *epsilon*-капролактама *Brevibacterium epidermidis* BS3 и перспективы его использования в биоремедиации 125

Ефимова В.А., Ахапкина С.С., Селезнев А.О.
Скорость роста колонии Aspergillus unguis в присутствии Stenotrophomonas rhizophila 127

Зотова О.А., Маканина О.А.
Выделение из разложившейся древесины лигнинолитических микроорганизмов и их характеристика 129

Иминова Л.Р., Поливцева В.Н., Абашина Т.Н., Сузина Н.Е., Соляникова И.П.
Выживаемость бактерий-деструкторов при культивировании с растворителями и хладагентами..... 131

Коллеров В.В., Брагин Е.Ю., Пошехонцева В.Ю., Шутов А.А., Сузина Н.Е., Донова М.В.
Идентификация и биокаталитическая характеристика новых стероид-трансформирующих актиномицетов: синтез 20β-восстановленных прогестинов - биорегуляторов репродуктивной функции костистых рыб 133

Королев Н.А., Кирьянова Т.Д., Егорова Д.О.
Бактериальная деструкция монохлорированных бифенилов в присутствии легко доступного источника углерода на примере штамма *Rhodococcus* sp. FG1..... 135

Кульбаева Л.А., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Мухаматдьярова С.Р., Искужина М.Г., Коршунова Т.Ю.
Влияние комплексного загрязнения почвы на рост и физиологическое состояние ячменя 137

Ласточкина Е.Э., Волкова Е.С., Васильева Ю.А., Рудакова Н.Л.
Характеристика биоконтрольного потенциала штамма *Bacillus subtilis* IV3 с нарушенной экспрессией гена сурфактина..... 139

Лобастова Т.Г., Николаева В.М., Казанцев А.В., Донова М.В.
Биоконверсия литохолевой и хенодезоксихолевой кислот штаммами 141

Мамчур А.А., Волкова Е.С., Васильева Ю.А., Ласточкина Е.Э., Шарипова М.Р.
Исследование антагонистической активности ризосферного штамма *Bacillus velezensis* IV1 в отношении фитопатогенных микроорганизмов 143

Минкевич И.Г.
Варианты путей конверсии малата в оксалоацетат в цикле Кребса 145

Мнеян М.А.
Сравнительная характеристика штаммов *Aneurinibacillus migulanus* – продуцентов пептидного антибиотика грамицидина S 147

Норкозиева Озода
Выделение винка-алкалоидов из растения Catharanthus roseus и их применение в фармацевтической отрасли 148

Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.
Готовы ли биосенсоры к новым вызовам? 150

Поливцева В.Н., Анохина Т.О., Есикова Т.З., Сузина Н.Е., Соляникова И.П.
Биодеградация высоких концентраций фенола штаммом *Rhodococcus opacus* 3D: биохимические и генетические аспекты 152

Попова А.А., Шеховцова Н.В.
Активность микроорганизмов-деструкторов масляной фракции нефти 154

Пучков Е.О., Рыжманова Я.В., Щербакова В.А., Качалкин А.В., Беккаревич А.О.
Новая система лиофилизации Всероссийской коллекции микроорганизмов: разработка, изготовление и испытание 156

Пучков Е.О.
Компьютеризация подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри с использованием вэб-камеры и программы ImageJ 158

Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Горина С.Ю., Коломыцева М.П.
Разработка способов получения метилмуконовой кислоты на основе рекомбинантной катехол 1,2-диоксигеназы 161

Рукавцова Е.Б., Шмарев А.Н., Креславский В.Д., Звонарев А.Н., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Филонов А.Е., Ариповский А.В., Захарченко Н.С.
Колонизация ассоциативными микроорганизмами и обработка препаратом Абиопептид® улучшает рост растений *Brassica juncea* L. и их устойчивость к стрессам 163

Самигуллина С.Р., Биджиева С.Х., Назина Т.Н.
Воздействие биоцидов на образование сульфида прокариотами из Приразломного нефтяного месторождения 164

Тайлаков А.А.
Оценка потенциала завальных зон угольных шахт для контролируемой генерации биометана 166

Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Г., Перчиков Р.Н., Решетилов А.Н.
Одностадийное формирование высокопроводящего электрода для микробного БТЭ 168

Тимакова Т. А., Текучева Д.Н., Карпов М.В., Фокина В. В., Шутов А.А., Донова М. В.
Получение тестостерона в ферментёрах при биоконверсии фитостеринов трансгенным штаммом *mycolicibacterium neoaurum* 170

Федорова Е.С., Хакимова Л.Р., Миннибаева А.В., Фазлинурова Р.Р., Чубукова О.В., Вершинина З.Р.
Стабильность капсул с лактобациллами с использованием альгината натрия и хитозана 172

Фокина В.В., Карпов М.В., Донова М.В.
Получение холестериноксидаз I и II типа в клетках актинобактерий..... 174

Фуфаева С.Р., Цуриков А. В., Довбня Д.В., Донова М.В.
Кандидатные гены из *Nocardioides simplex*, кодирующие 3α(20β)-гидроксистероиддегидрогеназы 175

Хохлова Г.В., Короткова Н.А., Барановская В.Б., Тихонов К.Г., Кулаковская Т.В., Вайнштейн М.Б.
Специфичность аккумуляции марганца, железа и неодима бактериями *Sphaerotilus montanus* и *Rhodococcus ruber SiAl* 177

Шайкин А.А., Абашина Т.Н., Кумар С., Вайнштейн М.Б.
Исследование влияния лития на Haloarcula hispanica и Haloferax gibbonsii 179

Ячкула А.А., Кувичкина Т.Н., Звонарев А.Н.
Применение амперометрического метода для сравнения химической и биологической коррозии стали бактериями *Acidithiobacillus ferrooxidans*..... 180

СЕКЦИЯ 1
Микробное разнообразие и экология микроорганизмов

Геномный анализ Ln^{3+}-зависимой метилотрофии у нового представителя рода *Jiella*

Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.

Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино
nadyagafonova@gmail.com

Ключевые слова: *Jiella,* метилотрофные бактерии, метанолдегидрогеназа.

Метилотрофные микроорганизмы способны использовать различные C_1-соединения в качестве источников углерода и энергии. Одним из недавних наиболее важных открытий в исследованиях метилотрофии является обнаружение лантанид(Ln^{3+})-зависимой метанолдегидрогеназы (МДГ) XoxF типа у бактерий, растущих на метаноле, но лишенных классической кальций-зависимой МДГ (MxaF). Добавление лантаноидов в среды культивирования позволило выделить ряд бактерий, обладающих только *xoxF* генами, что существенно расширило представления о таксономическом разнообразии метилотрофных микроорганизмов. Ранее на минеральной среде К с 20 μM $La(NO_3)_3$, 3% NaCl и метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии из проб соленой почвы техногенного биотопа (г. Соликамск, Пермский край) нами был изолирован новый Ln^{3+}-зависимый метилотрофный штамм МН4 (ВКМ В-3413). На основании филогеномного анализа, штамм МН4 идентифицирован как новый представитель рода *Jiella* (номер генома в NCBI GenBank JAJAVB000000000.1).

Цель работы – геномный анализ метаболизма метанола у нового изолята.

Поиск генов и их аннотацию проводили с помощью сервисов KEGG (https://www.kegg.jp/blastkoala/) и RAST (https://rast.nmpdr.org/) с последующей проверкой аннотации в результате сравнения последовательностей предсказанных белков с базами данных NCBI.

Геномный анализ штамма МН4 выявил наличие трех генов, кодирующих МДГ, катализирующую окисление метанола до формальдегида у большинства грамотрицательных метилотрофных бактерий, при этом все они кодировали только Ln^{3+}-содержащие МДГ XoxF-типа (локусы LH400_12635, LH400_08705 и LH400_06920). Известно, что белки XoxF филогенетически разнообразны и делятся как минимум на пять различных групп (XoxF1 – XoxF5) (Chistoserdova et al., 2011; Keltjens et al., 2014), при этом, как правило, идентичность аминокислотных последовательностей гена XoxF внутри одной группы составляет более 65–70%, тогда как между группами – менее 50% (Keltjens et al., 2014). Наиболее распространённым типом xoxF-МДГ у известных метилотрофов является *xoxF5*, который, как и *xoxF4*, обнаруживается в большинстве геномов метилотрофов вместе с геном *xoxF3* и/или *mxaF* (Ramachandran, Walsh, 2015; Taubert et al., 2015; Vekeman et al., 2016). На основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей белков XoxF штамма МН4, его ближайших родственников из семейства *Aurantimonadaceae* и других метилотрофных бактерий, выявлено, что два из трех генов *xoxF* штамма МН4 (локусы LH400_12635 и LH400_08705) относились к МДГ семейства XoxF5, а один, из локуса LH400_06920, – к МДГ семейства XoxF3.

Последовательность гена *xoxF5* из локуса LH400_12635 имела 87.5–88.4% и 83.6–86.2% сходства с представителями родов *Jiella* и *Aurantimonas,* соответственно, и 82.7% – с *Fulvimarina pelagi* КСТС 12091^T. Последовательность гена *xoxF5* из локуса LH400_08705 имела 77.3% сходства с *xoxF5 J. flava* CQZ9-1^T, 71.5–71.6% с *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T и *M. radiotolerans* JCM 2831^T, 67.5% с *Paracoccus denitrificans* PD1222 и 63.0–65.3 % с представителями рода *Aurantimonas*. Последовательность гена *xoxF3* из локуса LH400_06920 была на 75.7% идентична *A. marina* SW136^T, на 71.4% – *F. pelagi* КСТС 12091^T и на 68.0–69.6% – штаммам *Bradyrhizobium* spp. STM 3843 и ORS 375. Кроме того, впервые установлено, что штаммы *J. pacifica* 40Bstr34^T, *J. pelagia* HL-NP1^T, *A. aggregata* КСТС 52919^T и *A. endophytica* CBSQ-3^T обладали генами классической МДГ (*mxaF*) и

были филогенетически близки с таковыми у *F. pelagi* КСТС 12091^T (86.8–88.5%), а также с автотрофными метилотрофными бактериями родов *Paracoccus* (80.1–81.0%) и *Ancylobacter* (77.7–80.5%). При этом способность к метилотрофии у представителей семейства *Aurantimonadaceae* ранее упоминалась лишь для штамма *J. endophytica* (Valdivia-Anistro et al. 2022), а наличие специфических метилотрофных модулей – только для *F. pelagi* КСТС 12091^T (Chistoserdova, 2011).

Согласно геномному анализу ген *xoxF3* (локус LH400_06920) и *xoxF5* (локус LH400_12635) штамма МН4, кластеризовались с генами цитохрома *c* (*xoxG*), цитохром *c* оксидазы (*coxABC*) и ABC-транспортным субстратсвязывающим белком, и, вероятно, формировали кластеры, гомологичные оперону классической Ca^{2+}-зависимой МДГ. Ген *xoxF5* из локуса LH400_08705 располагался обособленно и не кластеризовался с другими генами, необходимыми для активности МДГ, что, в целом, характерно для белков XoxF5, несколько орфанных копий которых часто обнаруживают в геномах метилотрофов (Keltjens et al., 2014). Штамм МН4 обладал генами ТГМП-связанного пути окисления формальдегида (*fae*, LH400_12490; *mtdA*, LH400_12465; *mch*, LH400_12475; *fwdABC*, LH400_12435–12445), также как и генами, участвующими в окислении формиата (LH400_07660–LH400_07690). Кроме того, в геноме обнаружены генетические детерминанты ключевых ферментов серинового пути (icl^+ вариант), о чем свидетельствует наличие гидроксипируватредуктазы (*hpr*, LH400_18815), серин-глиоксилатаминотрансферазы (*sga*, LH400_18805) и гена *aceA* (LH400_09255), кодирующего изоцитратлиазу. Также найдены гены, участвующие в цикле Кальвина-Бенсона: рибулозобисфосфаткарбоксилаза (*cbbLM*, LH400_15070–LH400_15075), фосфоглицерокиназа (LH400_08225), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (LH400_06440), триозофосфатизомераза (LH400_14130), фруктозобисфосфатальдолаза (LH400_15065), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (LH400_15050), транскетолаза (LH400_15060), фосфорибулокиназа (LH400_15055), рибозо-5-фосфатизомераза (LH400_08720). Для ряда метилотрофных бактерий, таких как *F. pelagi*, *Ruegeria pomeroyi*, *Burkholderia phymatum*, представителей рода *Paracoccus*, *P. denitrificans* ISTOD1, *Paracoccus* spp. штаммов MKU1 и N5, ранее также описано одновременное наличие нескольких специфических метаболических модулей метилотрофии (как серинового цикла, так и цикла Кальвина-Бенсона) (Chistoserdova et al., 2011; Czarnecki and Bartosik, 2019; Puri et al., 2020).

Таким образом, согласно анализу генома, новый метилотрофный штамм МН4 (ВКМ В-3413) обладает тремя копиями генов XoxF-МДГ из XoxF3 и XoxF5 семейств, которые имели наибольшее сходство с таковыми у представителей родов *Jiella* и *Aurantimonas*, а также генетическими детерминантами РБФ и icl^+-варианта серинового путей C_1-метаболизма. Кроме того, проведенный анализ позволил впервые обнаружить гены МДГ (как *mxaF,* так и *xoxF*) у представителей родов *Jiella* и *Aurantimonas,* что расширило представление о метилотрофных микроорганизмах семейства *Aurantimonadaceae*.

Работа выполнена в рамках реализации Госзадания Министерства образования и науки РФ FMRM-2022-0019.

Оценка бактериального разнообразия компоста пищевых отходов растительного и животного происхождения

Анисимова Л.Г.

ГБУ РБ «Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством Академии наук Республики Башкортостан», Уфа
puzzle111@yandex.ru

Ключевые слова: компостирование, биоразнообразие бактерий, физиолого-биохимические признаки бактерий.

Компостирование — это процесс биологического окисления органического субстрата под действием смешанной популяции микроорганизмов, зависящей от ряда физиологических, физико-химических и микробиологических факторов. В процессе компостирования участвуют множество микроорганизмов, среди них только известных видов бактерий идентифицировано более двух тысяч (Ножевникова и др., 2019).

Несмотря на то, что процесс компостирования считается достаточно хорошо изученным, его микробное разнообразие исследовано недостаточно, поэтому представляется перспективным провести поиск бактериальных культур участвующих в процессе компостирования пищевых отходов растительного и животного происхождения, а также охарактеризовать их физиолого-биохимические признаки.

С целью прямого выделения бактериальных штаммов 1г компоста добавляли в колбу со 100мл стерильной воды и помещали на шейкер для инкубации. Затем методом серийных разведений содержимое колб рассевалось на чашки Петри, с агаризованными богатыми и минимальными солевыми средами, а именно: МПА, LB, MMS (среда с метанолом), Муромцева, Эшби (Нетрусов, 2005). Метод накопительных культур использовали для выявления представителей осуществляющих I и II фазы нитрификации. По 1г. компоста добавляли в две колбы, одна из которых содержала среду I фазы нитрификации, а вторая – среду II фазы нитрификации (Нетрусов, 2005) и помещали на шейкер для инкубации. Затем методом серийных разведений содержимое колб рассевалось на чашки Петри, содержащие агаризованные варианты сред I и II фазы нитрификации, соответственно. Далее из выделенных изолятов получали чистые культуры бактерий, их чистоту оценивали визуально и методом микроскопирования.

Из образцов компоста на различных средах были выделены одиннадцать бактериальных культур с визуально различающимися колониями. Далее проводилась оценка их физиолого-биохимических признаков, а именно: способности использовать различные соединения углерода (Нетрусов, 2005) (табл. 1-3).

Табл. 1. Использование изолятами углеводов, как единственных источников углерода.

штаммы	углеводы							
	мальтоза	арабиноза	лактоза	ксилоза	галактоза	глюкоза	сахароза	Контроль (LB)
МУР-1	++	+++	–	++	+	++	–	+++
МУР-2	++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++
МУР-3	–	+++	–	+++	+++	+++	–	+++
МУР-5	+++	++	+	++	+++	+++	+++	+++
LB-2	–	++	–	++	++	++	–	+++
МЕТ-1	++	++	+++	++	++	+	+++	+++
МЕТ-3	+	–	–	–	–	–	–	++
МПА-3	++	++	++	++	++	++	++	+++
ВИН-1	++	++	++	++	++	++	++	++
ВИН-3	++	–	–	–	–	++	–	+++
ЭШ-1	++	++	–	++	++	+++	++	+++

Табл. 2. Использование изолятами спиртов, как единственных источников углерода.

штаммы	спирты						
	инозит	манит	этанол	дульцит	глицерин	сорбит	контроль (LB)
МУР-1	–	+ желт	–	–	+ желт	–	++
МУР-2	+ желт	+ желт	–	+ желт	+ желт	+ желт	++
МУР-3	–	–	–	–	++ желт	–	+++
МУР-5	–	++ желт	+ желт	++ желт	+ желт	++ желт	++
LB-2	–	–	–	–	+++ желт	–	+++
МЕТ-1	–	++ желт	+ желт	+ желт	+ желт	+ желт	++
МЕТ-3	–	+ желт	+ желт	+ желт	++ желт	+ желт	+
МПА-3	+++желт	++ желт	++желт	++ желт	+++ желт	+ желт	+++
ВИН-1	+ желт	+ желт	+ желт	–	–	–	+
ВИН-3	–	+ желт	–	–	–	–	+++
ЭШ-1	++ желт	++ желт	–	–	+ желт	++ желт	++

Табл. 3. Использование изолятами солей органических кислот, как единственных источников углерода.

штаммы	Соли органических кислот					
	лактат	ацетат	цитрат	оксалат	пируват	контроль (LB)
МУР-1	++ син	–	–	–	–	+++
МУР-2	+ син	–	+ син	+ желт	+	+++
МУР-3	++ син	+++син	+++ син	+	+	+++
МУР-5	++ син	+++ син	+++ син	++ желт	+	+++
LB-2	+++	+++ син	+++ син	+	+	+++
МЕТ-1	+ син	+++ син	+++ син	+++ желт	++ желт	+++
МЕТ-3	–	+ син	+ син	++ желт	+	+
МПА-3	+++	+ желт	+++	++ желт	++	+++
ВИН-1	–	–	++	++ син	++	+++
ВИН-3	–	+++ син	+++ син	+	+++	+++
ЭШ-1	++ син	–	–	–	–	+++

Условные обозначения: от «+++» до «+» - градация степени бактериального роста от большего к меньшему, «–» - отсутствие роста, в таблице также приводится изменение цвета среды (индикатор бромтимолблау) с первоначального зеленого на желтый или синий после культивирования.

В результате работы было проведено выделение одиннадцати чистых культур из образцов компоста пищевых отходов растительного и животного происхождения, а также проведено исследование спектра их активностей по отношению к различным соединениям углерода, как его единственного источника.

Список литературы:

1. Нетрусов А.И. (ред) (2005) Практикум по микробиологии. Учебное пособие для вузов // Академия. Москва: 608.
2. Ножевникова А. Н., Миронов В.В., Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Русскова Ю.И. Состав микробного сообщества на разных стадиях компостирования, перспектива получения компоста из муниципальных органических отходов //Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 3. С. 211–221.

Таксономическое разнообразие и биодеградативный потенциал микробного сообщества сероземной почвы полигона «Даулет Азия» (Южный Казахстан) при нефтяном загрязнении

Барабошкина А.В. [1,2]***, Кужамбердиева С.*** [3]***, Нарманова Р.А.*** [3]***, Аппазов Н.О.*** [3]***, Делеган Я.А.*** [2]***, Кочаровская Ю.Н.*** [2]***, Богун А.Г.*** [2]***, Пунтус И.Ф.*** [2]***, Ахметов Л.И.*** [2]***, Ветрова А.А.*** [2]***, Сулейменов Н.*** [3]***, Ниязова Д.*** [3]***, Еспанова И.*** [3]***, Канжар С.*** [3]***, Алимхан Б.*** [3]***, Филонов А.Е.*** [2]

[1]Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,
[2]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологиии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[3]Кызылординский государственный университет им. Коркыт-Ата
angelina.post@bk.ru

Ключевые слова: биоремедиация, нефть, сероземы, резко континентальный аридный климат, микроорганизмы-деструкторы.

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами в настоящее время является глобальной угрозой. Особенно актуальна проблема очистки почв от подобных загрязнений на территориях, где ведется активная добыча и транспортировка нефти. В число стран-лидеров по добычи нефти входит Республика Казахстан. Характерной особенностью Приаральского региона Казахстана является резко континентальный климат, с высокими значениями температуры и низкой влажностью в летний период, что следует учитывать при разработке стратегий очистки от нефтеных загрязнений.

Целью данной работы было исследование влияния нефтяного загрязнения на таксономическое разнообразие и численность микробного сообщества сероземной почвы полигона «Даулет Азия» и оценка биодеградативного потенциала аборигенных почвенных микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Для исследования была использована почва полигона «Даулет Азия» (Кызылорда, Казахстан). Влажность почвы за период наблюдений (02 августа– 01 ноября 2024 г.) составила 1,2-1,4%, содержание гумуса – 0,1-0,4%. Значения pH водной вытяжки варьировали от 7,5 до 8,3, температура воздуха колебалась от 41°C в августе до 0°C в ноябре 2024 г. Таким образом, для данной почвы характерны дефицит воды, органического вещества, низкое содержание биогенных веществ (N, P, K). Уровень загрязнения почвы сырой нефтью был 4.1% вес./вес. В течение эксперимента общая убыль нефти была незначительна (8.59% на 60 сутки от исходного количества), что, вероятно, обусловлено низкой численностью и слабой деградативной активностью аборигенных почвенных углеводородокисляющих микроорганизмов. Так, в исследуемой почве общая численность культивируемых микроорганизмов была невысокой – $2\text{-}4\times10^6$ КОЕ/г почвы, а численность углеводородокисляющих микроорганизмов составляла всего – $2\text{-}4\times10^2$ КОЕ/г почвы. Низкая численность почвенных микроорганизмов может быть следствием влияния ряда абиотических факторов: экстремально низкой влажностью почвы (не более 1,2%), низким содержанием биогенных элементов (фосфора, азота, калия), низким содержанием органического вещества (содержание гумуса 0,1-0,4%).

По результатам метагеномного анализа аборигенного почвенного сообщества было выявлено 6 типов, 7 классов, 50 семейств и 127 родов бактерий. Доминирующим типом бактерий был *Pseudomonadota*, представленный двумя классами *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria*. Коровый микробиом сообщества составляли рода: *Stenotrophomonas, Achromobacter, Ochrobactrum, Pedobacter, Methylococcus, Brevundimonas, Pseudomonas, Rhizobium, Alcaligenes, Sphingobacterium, Escherichia/Shigella, Serratia и Rhodococcus.*

Как известно из литературных данных, представители всех перечисленных родов обладают деградативным потенциалом, однако по результатам оценки эффективности деструкции нефти аборигенным микробиомом способность почвы к самоочищению выражена незначительно (убыль нефти на 60 сутки составила 8.59%, что может быть следствием недостаточной численности и биодеградативной активности исследуемого почвенного микробиома.

Однако из почвенных образцов были выделены аборигенные микроорганизмы-нефтедеструкторы – *Kocuria rosea* K1, *Rhodococcus corynebacterioides* K18 и *Rhodococcus corynebacterioides* MF2. Штаммы были охарактеризованы по способности к росту на различных

углеводородных субстратах, при различных значениях температуры и pH среды, при различном содержании хлорида натрия в ростовой среде. Все штаммы способны утилизировать гексадекан, фенол и дизельное топливо, штамм К1 также способен к росту на нафталине, салицилате, бензоате и толуоле, штамм К18 – на нафталине, додекане и толуоле; MF2 – на додекане. *Kocuria rosea* К1 способен к деградации дизельного топлива в широком температурном диапазоне (6-45°С), при pH от 4 до 10 и при содержании NaCl в среде до 10%. *Rhodococcus corynebacterioides* К18 и *Rhodococcus corynebacterioides* MF2 способны к деградации дизельного топлива в следующем температурном диапазоне: штамм К18 – от 20 до 45°С, штамм MF2 – от 20 до 37°С; при pH от 5 до 10 и от 6 до 10 соответственно, и при содержании NaCl в среде до 3 % для обоих штаммов. Все три исследованных штамма были способны к росту при 37°С на нефти и мазуте в качестве единственного источника углерода.

Таким образом, выделенные аборигенные штаммы К1, К18(2) и MF2 имеют биодеградативный потенциал и могут быть использованы для биоремедиации загрязненных нефтью территорий.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность почвы полигона «Давлет Азия» к самоочищению крайне низкая. Поэтому для эффективной очистки почвы от нефтяного загрязнения целесообразна интродукция активных микроорганизмов-нефтедеструкторов (возможно, в составе биопрепаратов). Следует отметить, что в условиях резко континентального аридного климата для биоремедиации нефтезагрязненных территорий оправдано использование галотолерантных микрорганизмов-нефтедеструкторов с широким температурным диапазоном, способных к деградации углеводородов при экстремально низкой влажности.

Работа выполнена при поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан за счет грантового финансирования № AP23489931.

Вирулентные бактериофаги энтерококков

Бузиков Р.М.[1], Шадрин А.М.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
a87h5n1@gmail.com

Ключевые слова: энтерококки, бактериофаги, биоразнообразие.

Все чаще в медицинской практике встречаются полирезистентные возбудители, что обостряет и без того серьезную проблему госпитальных инфекций. Энтерококки, включенные ВОЗ в высокоприоритетную группу ESKAPE, часто вызывают оппортунистические микст-инфекции и служат источником генов антибиотикорезистентности, для грамположительных кокков. Они нередко заражены профагами, способными к трансдукции, и устойчивы к окружающей среде, что требует улучшения профилактики и лечения нозокомиальных энтерококкозов. Антибиотикотерапия нуждается в дополнении альтернативными методами. Фаготерапия наиболее перспективна благодаря неисчерпаемой изменчивости фагов, их избирательному действию (что снижает ущерб нормофлоре) и возможности комбинации с пробиотиками для предотвращения реинфекций. Из-за узкого спектра фагов предпочтительны "фаговые коктейли" – смеси фагов с разным литическим спектром. Это требует не только совершенствования принципов подбора компонентов и создания крупных коллекций фагов, но и разработки новых подходов и методов работы с бактериофагами.

Бактериофаги ценны не только как терапевтические агенты, но и как источник ферментов, а также модель для фундаментальных исследований. Их литические ферменты могут разрушать биопленки, усиливая эффект фагов и антибиотиков.

Сточные воды богаты биоразнообразием фагов, активных против энтерококков: они различаются по филогенетическим группам, геномной организации, морфологии, стабильности вирионов, спектру инфицируемых энтерококков и течению инфекций. В рамках этой работы были выделены вирулентных бактериофагов, способные лизировать энтерококки различных видов (*E. avium, E. durans, E. faecalis, E. faecium, E. hirae, E. thailandicus)*, а также дана оценка биоразнообразия, морфологических, физиологических и генетических свойств изолированных бактериофагов. В качестве эталона для оценки практического потенциала использован терапевтический бактериофаг vB_Efa_iF6, успешно применяемый в фаготерапии в составе препарата Секстафаг® НПО «Микроген».

Из 96 первичных изолятов, отобрано 6 уникальных по морфологии бляшек, ПЦР-профилю и литической активности. Кроме того, отобранные фаги нарабатывались в концентрациях $\geq 10^9$ БОЕ/мл. ПЦР-анализ с праймерами на высоко вариабельные регионы (например, локусы встраивания гена HNH эндонуклеазы), позволяет быстро и с минимальными затратами выявлять однотипные изоляты бактериофагов.

Геномы фагов были секвенированны на платформе Illumina и функционально аннотированы. У всех отобранных фагов нет генов токсинов, антибиотикорезистентности или лизогении. Филогеномный анализ продемонстрировал значительное биоразнообразие исследуемых фагов: к роду *Kochikohdavirus* принадлежит фаг vB_Efs_1A5; фаги vB_Efs_3A2 и vB_Edu_21C1 представители филогенетически близкого рода – *Schiekvirus,* а сифовирусы vB_Edu_SC и vB_Efa_SA относятся к роду *Saphexavirus.* Отдельный интерес вызывает обнаружение бактериофага vB_Ela_22C1 – представителя малоизученного рода *Efunavirus* и vB_Ela_1E1 – фага нового рода *«candidatus Pyatigorskvirus»* семейства *Rountreeviridae* (Рис.1). Для подовируса vB_Ela_1E1 характерен линейный геном с терминальными белками на 5’-концах, состоящий из 18 085 п.н., включающий всего лишь 22 ОРС, организованных в два конвергентных модуля. Негативные колонии этого фага значительно крупнее обычного: достигают в диаметре до 3 мм и имеют зону гало. Фаг vB_Ela_1E1 может стать как источником ферментов для терапии и молекулярной биологии, так и удобной моделью, для работ по инженерии бактериофагов с заранее заданными свойствами.

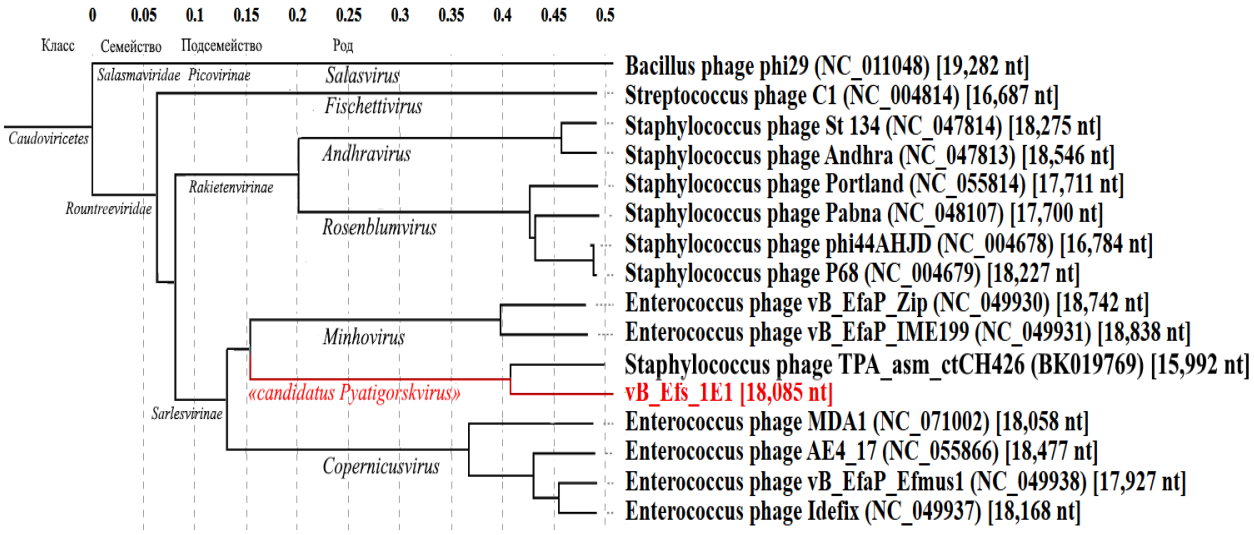


Рис. 1. Филограмма бактериофага vB_Ela_1E1

Вирионы вирулентных фагов энтерококков представлены сифо-, подо- или миовирусными типами хвостатых фагов (Рис.2). Они полностью лизируют растущие клетки, но против стационарных культур энтерококков проявляют только бактериостатический эффект. Только vB_Ela_1E1 требует повышенной концентрации Ca^{2+}в среде для повышения своей эффективности. Все исследованные фаги стабильны при физиологическом pH; но *Efunavirus* vB_Ela_22C1 и *Schiekvirus* vB_Edu_21C1 термолабильны.

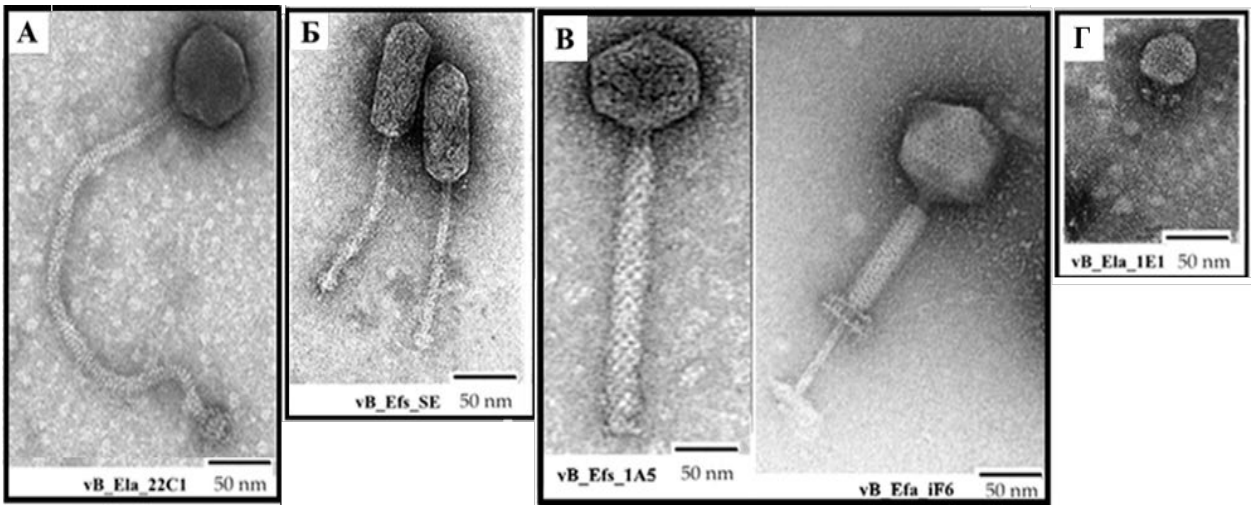


Рис. 2. Разнообразие морфологии исследуемых вирионов. Просвечивающая электронная микроскопия, контрастирование уранилацетатом.

Фаги *Kochikohdavirus* vB_Efa_1A5 и «*candidatus Pyatigorskvirus*» vB_Ela_1E1 имеют прикладной потенциал, сопоставимый с референтным терапевтическим *Schiekvirus* vB_Efa_iF6.

Фаг vB_Ela_1E1 продуктивно инфицировал только энтерококки, уже зараженные профагом (например, vB_ElaS_B1578), что подчеркивает необходимость выявления легкоиндуцируемых профагов в производственных штаммах бактерий.

Структурно-функциональное разнообразие грибных сообществ атмосферной пыли: современные подходы метабаркодинга и экосистемная значимость

Ветрова А.А., Иванова А.А., Сазонова О.И.

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

Ключевые слова: сообщества микромицетов, атмосферная пыль (PM10), метабаркодинг, экосистемные функции, биотехнологический потенциал

В последние годы значительно возрос интерес к исследованию микроскопических грибов, которые играют ключевую роль как в формировании структуры и функционирования микробных сообществ, так и в процессах биоразнообразия в различных экосистемах. Прогресс молекулярно-биологических и биоинформатических методов расширил понимание таксономического состава и физиологических особенностей грибов атмосферной пыли, а также позволил оценить их биотехнологический потенциал. Изучение структуры и функций грибных сообществ необходимо для прогноза их вклада в циркуляцию органических веществ и адаптацию к антропогенному воздействию. Цель настоящей работы заключается в комплексном исследовании структурного и функционального разнообразия микроскопических грибов, обнаруживаемых в атмосферной пыли трех городов (Москва, Мурманск и Рим), с использованием методов ДНК-метабаркодинга и последующего функционального анализа, а также в оценке вклада идентифицированных таксонов в экосистемные и биотехнологические процессы урбаэкосистем.

Применение секвенирования ITS-регионов микромицетов с последующим анализом данных (Illumina MiSeq, DADA2, база UNITE) обеспечило детальное изучение структуры микробиоты и позволило идентифицировать как доминирующие, так и редкие таксоны. В ходе исследования было установлено, что в составе грибных сообществ атмосферной пыли доминируют представители отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota*, их соотношение и разнообразие зависят от условий окружающей среды и сезона отбора проб, варьируя от 19,6 до 85,7% для *Ascomycota* и от 12,5 до 80,1% для *Basidiomycota*. Среди ведущих классов выявлялись *Dothideomycetes, Agaricomycetes, Leotiomycetes* и *Microbotryomycetes*, что демонстрирует широкий спектр функциональных стратегий и эколого-адаптационных возможностей грибов. Было оценено альфа-разнообразие сообществ на основании индексов Chao1 и Shannon, а также бета-разнообразие с использованием многофакторного анализа (PCoA, PERMANOVA).

Особую роль в структуре микробных сообществ играют роды *Cladosporium, Botrytis, Vishniacozyma, Alternaria, Aureobasidium* и *Bjerkandera*, многие из которых обладают высокой биотрансформационной активностью и могут быть потенциально полезны для разложения органических субстратов. Сетевой анализ экосистемных взаимодействий выявил существование "ключевых" таксонов-хабов, способных определять устойчивость структуры и функциональное единство микробиомов и играть ведущую роль в поддержании стабильности сообщества при внешних изменениях.

На основании проведённых исследований установлено, что грибные сообщества атмосферной пыли характеризуются не только значительной таксономической насыщенностью, но и выраженной функциональной пластичностью, что определяет их биосферную и биотехнологическую значимость. Результаты имеют практическое значение для разработки новых подходов к экологическому мониторингу, биоконтролю и оптимизации биотехнологических процессов, связанных с утилизацией органических загрязняющих веществ.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (Госзадание №FMRM-2022-0014).

Характеристика нового термотолерантного факультативного метилотрофа *Mycolicibacterium mageritense* Myc9

Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В.

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

Ключевые слова: метанол; метилотрофия; физиология; биохимия; полифазная таксономия; *Mycolicibacterium.*

Метанол образуется биогенно в почвенных и водных биотопах, синтезируется и широко используется в химической промышленности, крупнотоннажно производится в России. Метиловый спирт рассматривается как дешевый источник углерода и энергии для метилотрофных микроорганизмов при получении кормового белка, различных метаболитов, трансформации некоторых соединений. Наряду с этим, метилотрофы используются для биодеградации токсичных соединений и их биодетекции на биосенсорах (Троценко с соавт, 2010). Большинство научных и практических разработок по метилотрофным микроорганизмам посвящены грамотрицательным и преимущественно мезофильным бактериям. Термотолерантные грамположительные метилотрофы открывают новые возможности для использования метанола как источника углерода и энергии при получении продуктов микробиологического синтеза. Кроме того, пополнение фонда метилотрофных бактерий представителями малоизученных групп и изучение их свойств помимо прикладного имеет научный интерес по расширению знаний о метилотрофии и метилотрофных микроорганизмах.

Камчатка – уникальный регион России и термальные ландшафты Долины гейзеров изобилуют источниками, имеющими высокую природоохранную ценность, характеризуются уникальными эндотермальными почвами, которые поддерживают исчезающие виды растений и микроорганизмов. В связи с этим, представляет интерес выделение и изучение термофильных/термотолерантных микроорганизмов из этих биотопов.

Цель работы – таксономическая и физиолого-биохимическая характеристика нового термотолерантного факультативного метилотрофа, выделенного из образца почвы долины гейзеров Камчатки.

Из почвы Долины гейзеров (Камчатка) на минеральной среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии выделен факультативный метилотроф штамм Myc9. Изолят представлен аэробными грамположительными бесцветными неподвижными кислотоустойчивыми прямыми или Y- образными палочками. Споры, капсулы, воздушный мицелий не образует, не нуждается в витаминах и других факторах роста. Наряду с метанолом и формальдегидом использует широкий спектр полиуглеродных субстратов. В качестве источников азота использует нитраты, нитриты, соли аммония, мочевину и некоторые аминокислоты. Оптимально растет при 40-42 ºС, pH 6.8-7.2, 0-5% NaCl. В жирнокислотном составе клеток доминируют $C_{16:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:1}$ и туберкулостеариновая кислоты. Основным компонентом менахиноновой фракции является МК-9 (H_2). Имеет ФII тип фосфолипидов, IV тип клеточной стенки и высокое содержание миколовых кислот. Секвенирование гена 16S рРНК штамма Myc9 выявило 100% сходство с *Mycolicibacterium mageritense* DSM 44476^T. При росте на среде с метанолом при 40 ºС имеет μ_{max} 0.18±0.03 $ч^{-1}$. Реализует рибулозомонофосфатный путь C_1 - метаболизма, гексулозофосфатсинтаза синтезируется конститутивно. Клетки штамма Myc9 имеют высокое содержание флавинов, а при добавлении кобальта - витамина B_{12}. Таким образом, термотолерантный метилотроф *Mycolicibacterium mageritense* Myc9 перспективен как объект биотехнологических разработок по биосинтезу, биокатализу на основе метанола, а также биодетекции на биосенсорах.

Работа выполнена в рамках реализации Госзадания Министерства образования и науки РФ FMRM-2022-0019.

Список литературы

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М. Л. *Аэробные метилобактерии* (ОНТИ ПНЦ РАН, Пущино 2010).

Содержание нитчатых микроорганизмов в активном иле промышленных аэротенков

Козека О. Ю. Егорова А. В.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Беларусь
kozekaoksana@gmail.com

Ключевые слова: промышленные сточные воды, аэротенк, активный ил, гидробиологические показатели, нитчатые микроорганизмы.

С увеличением населения и промышленного потенциала страны растёт количество сточных вод. Среди применяемых методов очистки сточных вод биологическая очистка является наиболее экономически рентабельной и доступной, а на практике она чаще всего оказывается единственно возможной. В основе методов биологической очистки лежит использование микроорганизмов, разлагающих органические соединения в сточных водах. Чаще всего это аэротенки с активным илом, представляющим своеобразное сообщество разных видов микроорганизмов [1].

Для оптимальной работы активного ила необходимо присутствие в небольшом количестве нитчатых бактерий, обеспечивающих формирование «каркаса» вокруг которого образуются флоккулы, Помимо этого они являются активными окислителями органических веществ. Однако чрезмерное развитие нитчатых микроорганизмов приводит к нарушению седиментационных свойств активного ила может привести к выходу активного ила в природную среду [2].

Цель работы – определение количества и размерности нитчатых микроорганизмов а активном иле аэротенков предприятия по производству азотсодержащих соединений и удобрений.

На территории ОАО «Гродно Азот» формируются несколько систем промышленных канализаций сточных вод, отличающихся расходом и физико-химическим составом. В основе очистки промышленных сточных вод от азотсодержащих веществ лежат процесс биологической нитрификации и процесс биологической денитрификации с самостоятельным активным илом для каждой стадии с последующей доочисткой стоков от органических загрязнений на аэротенках-вытеснителях.

Объектами исследования служили нитчатые формы микроорганизмов аэротенков. Для исследования отбиралась иловая смесь на выходе из аэротенков. Определяли такие гидрохимические показатели, как массовая концентрация активного ила, иловый индекс, прозрачность надиловой воды.

Для определения численности и размеров нитчатых бактерий активного ила использовали метод Виноградского. Фиксированный препарат готовили из 0,02 $см^3$ иловой смеси, окрашивали по методу Грама. Измерение нитчатых бактерий проводили с помощью окулярного микрометра при увеличении 10 х 100 [3].

В аэротенках предприятия по производству азотсодержащих соединений и удобрений массовая концентрация ила составляла 3,2 $г/дм^3$, что соответствует оптимальным значениям для биологической очистки сточных вод. Активный ил аэротенка обладает высокими седиментационными свойствами (иловый индекс 131 $см^3/г$). Надосадочная жидкость иловой смеси аэротенков прозрачная со светло-соломенным оттенком.

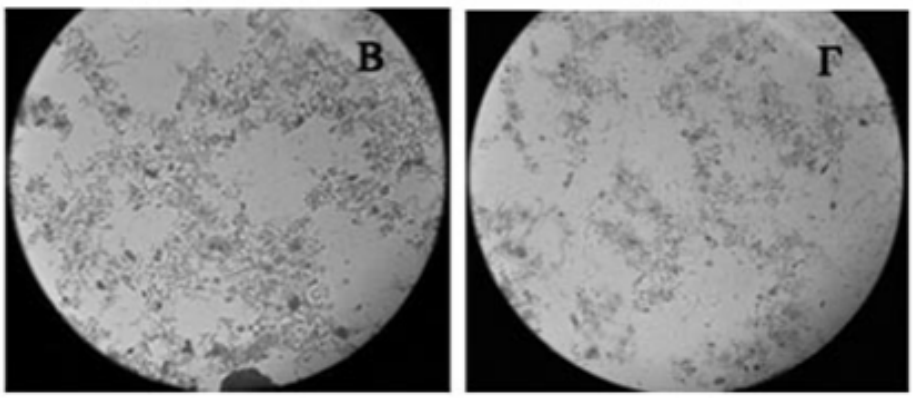


Рис. Хлопья активного ила промышленных аэротенков (увеличение х100)

В промышленных аэротенках формируются компактные отдельные хлопья, площадь которых достигают 0,64–4,00 мм^2, что и определяет высокую седиментационную способность данного ила. Структуру хлопьев определяет небольшое количество нитчатых форм бактерий с суммарной концентрацией филаментов 182 шт./см^3 и суммарной длиной всех нитей 5460 мкм/см^3.

Размер отдельных особей нитчатых микроорганизмов активного ила промышленного аэротенка колеблется от 0,99 до 38,20 мкм. Ранжирование размерности филаментов показало, что наибольшее количество микроорганизмов с нитчатой структурой находится в диапазоне длины 0–10 мкм (таблица). Длина отдельных нитей в хлопьях активного ила косвенно свидетельствует о формировании специфического видового состава нитчатых микроорганизмов вследствие определенных условий конкретного биореактора [2].

Табл. Размерность филаментов активного ила промышленных аэротенков

Размер	Численность филаментов, шт/см^3
0-10 мкм	1402
11-20 мкм	36
21-30 мкм	5
31-40 мкм	2

Таким образом, в аэротенках предприятия по производству азотсодержащих соединений и удобрений интенсивная аэрация и низкая концентрация сточных вод способствуют благоприятному режиму развития компактных флокул с оптимальным количеством филаментов и, как следствие, высокими седиментационными свойствами активности ила.

Список литературы:

1. Никитина О.Г. Биоэстимация: контроль процесса биологической очистки и самоочищения воды. М.: 2010. – 287 с.
2. Tandoi, V. Activated Sludge Separation Problems: Theory, Control Measures, Practical Experiences / V. Tandoi, D. Jenkins, J. Wanner. – London : IWA Publishing, 2006. – 216 p.
3. Методическое руководство по гидробиологическому контролю нитчатых микроорганизмов активного ила. ПНД Ф СБ 14.1.92-96. – М., 1996. – 18 с.

Распространение бактерий в торфах болот Тульской области

Коренкова А.К.[1], Захарюк А.Г.[2], Кочаровская Ю.Н.[2], Волкова Е.М.[1], Щербакова В.А.[2]

[1]Тульский государственный университет;
[2]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН
kuran82@mail.ru

Ключевые слова: анаэробные бактерии, торфяные болота, метабаркодинг, таксономическое разнообразие.

Болотные экосистемы выполняют критически важную функцию в глобальном цикле углерода, выступая как его аккумуляторами, так и источниками парниковых газов. Ключевым процессом, определяющим эту двойственную роль, является микробная деструкция органического вещества, которая с глубиной сменяется с аэробной на анаэробную. В рамках данного исследования была поставлена цель изучить вертикальное распределение анаэробных микроорганизмов, ответственных за терминальные стадии разложения, в торфяных залежах двух контрастных болот Тульской области.

Для этого проводился сравнительный анализ образцов торфа из эвтрофного пойменного болота Подкосьмово (низинный торф) и олиготрофного водораздельного болота Клюква (смешанная залежь из переходных и верховых торфов), характеризующихся значительными различиями в кислотности и минерализации.

Результаты микробиологического анализа выявили фундаментальные различия между объектами. В болоте Подкосьмово была зафиксирована высокая численность анаэробных гетеротрофов (до $2.5 \cdot 10^6$ кл/г), а также присутствие специализированных физиологических групп: железовосстанавливающих (до $2.5 \cdot 10^3$ кл/г) и сульфатредуцирующих (до 25 кл/г) бактерий и метаногенных архей (до 250 кл/г). Напротив, в олиготрофном болоте Клюква культивируемое микробное сообщество было значительно беднее, а сульфатредукторы и метаногены не обнаружены.

Изучение метаногенной активности подтвердило эти различия: значительное образование метана (30.84–77.2 мкмоль/г) было характерно для торфов болота Подкосьмово, в то время как болото Клюква не проявляло подобной активности.

Одним из наиболее информационных методов оценки разнообразия природных микробных сообществ являются метагеномные исследования. Нами было изучено таксономическое разнообразие в семи образцах торфа, отобранных из различных глубин исследуемых болот. Анализ данных метабаркодинга природных образцов показал, что во всех сообществах доминировали представители филумов *Acidobacteriota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Bacillota, Nitrospirota* и *Pseudomonadota.* Доминирующие представители варьировались в зависимости от болота и горизонта. В торфе болота Клюква наблюдалось изменения в структуре сообществ в зависимости от глубины отбора проб. Так в образце, отобранном с поверхности (0-20 см) преобладают представители двух филумов – *Acidobacteriota* (67.83%) и *Pseudomonadota* (20.43%). С увеличением глубины наблюдается тенденция к увеличению количества *Pseudomonadota* и уменьшению – *Acidobacteriota*, а на глубине 120 см отмечается появление третьего доминирующего филума – *Actinobacteriota*. В торфе болота Подскосьмово до глубины 90 см можно выделить относительную стабильность в структуре микробных сообществ. Преобладают представители трех таксонов – *Acidobacteriota*, *Pseudomonadota* и *Bacillota*. В самой глубокой точке отбора проб (90-100 см) отмечено увеличение количества *Pseudomonadota* на 20%, а также появление минорных компонентов сообщества *Bacteroidota* (5.51%) и *Nitrospirota* (5.65%). Несмотря на то, что бактериальный состав микробных сообществ был относительно схож, в разных типах болот зафиксированы некоторые различия. В пробах торфа Клюква выявлено семь индикаторных родов - *Occallatibacter*, *Granulicella*, Candidatus *Koribacter*, *Pseudorhodoplanes*, *Roseiarcus*, *Bradyrhizobium* и *Paludibacterium*. В пробах торфа болота Подкосьмово отмечено восемь родов-индикаторов: *Bauldia*, *MND1*, *Bacillus*, *Nitrospira*, *Thermoanaerobaculum*, *Acidaminobacter*, *RB41* и *Acinetobacter*.

Таким образом, показано, что доминирующими представителями природных микробных сообществ торфов болота Клюква являются микроорганизмы, осуществляющие аэробные и факультативно-анаэробные процессы деструкции органического вещества, в том числе сложных полисахаридов растительного происхождения в условиях кислых значений pH. Установлено, что микробное сообщество болота Подкосьмово более разнообразно. В различных горизонтах торфа здесь протекают как аэробные, так и анаэробные процессы. Полученные методом молекулярной биологии данные согласуются с результатами лабораторных экспериментов.

Численность и филогенетическое разнообразие прокариотных сообществ почвоподобных тел пещер Вьетнама

Косенко Н.Р., Лысак Л.В.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
nrkosenko@gmail.com

Ключевые слова: почвоподобные тела, солоиды, микробные сообщества, филогенетическое разнообразие, олиготрофные системы

Пещеры представляют собой уникальные экосистемы, где под воздействием экстремальных факторов (ограниченного поступления света, органического вещества) формируются особые биокосные образования – почвоподобные тела (ППТ) или солоиды. ППТ пещер служат моделью для исследования взаимодействия живого вещества с минеральными субстратами и процессов самоорганизации микробных сообществ в олиготрофных условиях.

Целью настоящей работы было изучение прокариотных сообществ почвоподобных тел пещер, а также оценка степени сходства с микробиомами сопряженных субстратов.

Объектами исследования являлись почвоподобные тела известковых пещер Тханьван и Лумкум, глинистой пещеры Пигми. В качестве контрольных объектов выступали близлежащие почвы – красно-желтая гумусно-ферраллитная и бурая лесная. Образцы были отобраны на территории Природного заповедника Батдайшон и Национального парка Фонгня–Кебанг.

Общая численность бактерий в ППТ была ниже, чем в близлежащих почвах, и изменялась в пределах 0,56 – 2,34 млрд клеток/г, когда в почвах – от 1,28 до 2,67 млрд клеток/г.

Длина актиномицетного мицелия в почвоподобных телах варьировала от 24,16 до 48,31 м/г, что ниже в 2-4 раза, чем в близлежащих почва (70,46 – 85,55 м/г).

Биомасса бактерий и актиномицетой в почвоподобных телах была также ниже, чем в сопряженных почвах, для всех образцов отмечалось преобладание биомассы актиномицетного мицелия.

Численность культивируемого сапротрофного бактериального комплекса (СБК) в ППТ составляла от 0,46 до 1,18 млн КОЕ/г и была в 2–3 раза ниже, чем в почвах (1,32 до 1,50 млн КОЕ/г). Среди культивируемых форм в ППТ доминировали рода *Streptomyces* и *Bacillus*.

Баркодинг гена 16S рРНК выявил в ППТ 25 филумов домена *Bacteria* и 2 филума домена *Archaea*. Для всех пещерных образцов отмечено преобладание филумов *Actinomycetota* и *Pseudomonadota*, а для ППТ пещеры Тханьван также филума *Chloroflexota*. Для трех пещер 16 филумов являлись общими, а 9 уникальными. В изученных образцах идентифицировано 89 родов домена *Bacteria*. Филум *Actinomycetota* имел наибольшую представленность на родовом уровне (45 родов), несколько меньше филум *Pseudomonadota* (43 рода). При сравнительном анализе с почвенным микробиомом выявлено сходство основных доминирующих филумом (*Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*), однако для почв также характерна высокая встречаемость филумов *Bacillota* и *Acidobacteriota*. Для пещеры Тханьван по сравнению с другими пещерами отмечено наибольшее α-разнообразие (индексы Шеннона, Симпсона). Иерархический кластерный анализ выявил наибольшую обособленность микробиоты ППТ пещеры Пигми, что подтвердилось при сравнении бактериальных сообществ метрикой сходства Брея–Кертиса. Анализ главных координат (PCoA) показал сходство микробиоты ППТ с листовым опадом.

Таким образом, полученные данные указывают на высокую филогенетическую насыщенность микробных сообществ почвоподобных тел пещер при низкой общей численности прокариот по сравнению с микробиомами почв. Сходство прокариотных сообществ ППТ с микробиомами сопряженных субстратов (почва и опад) свидетельствует о заносе микроорганизмов в пещеры с воздушными или водными потоками.

Поиск новых регуляторов сульфитредуктазы у сульфатредукторов филума Chloroflexota и анализ их потенциальных экологических ниш

Крылов К. И., Паринова Т. С., Дёмин К. А.

ЮФУ «Южный Федеральный Университет» (Академия биологии и медицины им. Д.И. Ивановского), Ростов-на-Дону
kikrylov@sfedu.ru

Ключевые слова: диссимиляционная сульфатредукция, цикл серы, Chloroflexota, нитчатые серные бактерии, симбиоз, эволюционная экология

Аннотация: в последние годы способность к сульфатредукции была обнаружена у представителей более чем 20 филумов прокариот [1]. Маркером диссимиляционной сульфатредукции является наличие гена DsrD, кодируемого в одном опероне наряду с сульфитредуктазой DsrAB. Ранее было охарактеризовано 4 типа DsrD, отражающих таксономическое разнообразие и экофизиологию различных групп сульфатредукторов: DsrD1 (в основном, Desulfobacterota), DsrD3 (в основном, Bacillota), DsrD4 (археи), DsrD2 (многочисленные филумы бактерий) [2]. В данной работе был идентифицирован 5-й тип DsrD, почти исключительно представленный внутри класса Anaerolineae (Chloroflexota), а также проанализированы возможные экологические ниши и причины эволюции последовательностей DsrD5 у класса Anaerolineae.

Актуальность: изучение эволюции отдельных компонентов сульфитредуктазного комплекса может помочь проследить распространение, эволюцию и экофизиологию различных групп сульфатредукторов.

Цель: проанализировать геномы с предполагаемым DsrD 5 типа и предположить их возможные экологические ниши.

Методы и результаты: 1473 уникальных последовательности белка DsrD были загружены из NCBI и использованы для обучения HMM-модели с помощью программы hmmer. HMM-модель была применена к 799129 протеомам бактерий и архей (732475 генома, индексируемых в GTDB и 66654 из NCBI). Все геномы, для которых были обнаружены совпадения с evalue $<1e10^{-12}$, а также в которых обнаруживались DsrAB, были проанализированы с помощью программы DiSCo [2] для обнаружения наличия и типа DsrD. Дальнейшему анализу подвергались геномы с DsrAB, содержащие последовательность DsrD, не попадающую ни в одну из четырех категорий согласно DiSCo. Выборку составили 53 генома Chloroflexota, 52 из которых принадлежали к классу Anaerolinea и 1 к классу FW602-bin22. Длина распознанных как DsrD белков составила в среднем 70 аминокислот (разброс от 67 до 75). Далее, предсказанные HMM-моделью и Disco в 799129 геномах гомологи DsrD (n=2296) использовались для построения множественного выравнивания и анализа главных координат по результатам последнего. Кластер последовательностей DsrD предполагаемого 5-го типа значимо отличался от остальных типов (p <0,05, PERMANOVA тест). Большая часть геномов с DsrD5 были собраны из метагеномов сред, характерных наличием резкого градиента кислорода и/или высокой температурой: донных отложений, горячих источников, анаэробных реакторов, шахтных хвостов.

Ранее нитчатые представители Chloroflexota обнаруживались в подобных местообитаниях внутри экзополисахаридных чехлов гигантских сероокисляющих серобактерий родов *Thioploca* и *Beggiatoa.* Их геномы не были секвенированы, а ампликоны рибосомальных генов не дают схожести с типовыми штаммами выше ~90%. Нами были взяты ампликоны (n=9) генов 16S rRNA таких симбиотических представителей из работ [3, 4] и картированы на геномы Anaerolinea с DsrABD (n=53), а также на геномы свободноживущих не редуцирующих сульфаты хлорофлексот (n=3) из донных отложений, богатых нитчатыми серобактериями, из работы [5]. Картирование проводилось с помощью blastn. Ампликоны симбиотических представителей Chloroflexota совпали на 95–98% с 16S rRNA геномов хлорофлексот с DsrD5, когда как схожесть со свободноживущими представителями не превышала 79–85%. Наибольшую схожесть все ампликоны проявили с 16S rRNA генома GCA_029782225 (Villigracilaceae), собранного из метагенома термофильного анаэробного реактора, а также с GCA_021787595 и GCA_021787595 (также Villigracilaceae, метагеномы шахтных хвостов).

Полученные результаты указывают на то, что сульфатредуцирующие бактерии класса Anaerolineae могут быть симбионтами сероокисляющих нитчатых бактерий, а их

последовательности DsrD, отличные от других сульфатредукторов, могут являться результатом адаптации к симбиотическим или полусимбиотическим условиям.

Список литературы:

1. Diao M. et al. Global diversity and inferred ecophysiology of microorganisms with the potential for dissimilatory sulfate/sulfite reduction //FEMS Microbiology Reviews. – 2023. – Т. 47. – №. 5. – С. fuad058.
2. Neukirchen S., Sousa F. L. DiSCo: a sequence-based type-specific predictor of Dsr-dependent dissimilatory sulphur metabolism in microbial data //Microbial genomics. – 2021. – Т. 7. – №. 7. – С. 000603.
3. Nemoto F., Kojima H., Fukui M. Diversity of freshwater Thioploca species and their specific association with filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi //Microbial ecology. – 2011. – Т. 62. – №. 4. – С. 753-764.
4. Chernitsyna S. M. et al. Microbial community associated with Thioploca sp. sheaths in the area of the posolsk bank methane seep, southern baikal //Microbiology. – 2016. – Т. 85. – №. 5. – С. 562-569.
5. Fonseca A. et al. Large Filamentous Bacteria Isolated From Sulphidic Sediments Reveal Novel Species and Distinct Energy and Defence Mechanisms for Survival //Environmental Microbiology. – 2025. – Т. 27. – №. 3. – С. e70083.

Выделение, идентификация и характеристика антагонистической активности бактерий, выделенных из эндосферы разных сортов картофеля

Никифорова А.А., Лутфуллин М.Т., Лутфуллина Г.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань
g.h95@mail.ru

Ключевые слова: эндофитные бактерии, картофель, опытные поля, идентификация, MALDI Biotyper, антагонистическая активность.

Картофель является четвертой по величине продовольственной культурой в мире. Урожайность и качество картофеля подвержены влиянию абиотических (температура, влажность, концентрация соли, тяжелые металлы) и биотических факторов (грибковые и бактериальные заболевания, насекомые) (Zhang et al. 2022). Эндофитные микроорганизмы могут оказывать положительное влияние на растение-хозяина, стимулируя его рост, повышая устойчивость к стрессам и болезням. Эндофиты — это большая группа микроорганизмов, которые живут в тканях растений, но не наносят им вреда (Khare et al. 2018). Распространение эндофитов универсально, и большое количество эндофитов можно выделить из разных частей растений, включая корни, стебли, листья, цветы, плоды, клубни, семена и клубеньки (Santoyo et al. 2016). Картофель в основном размножается клубнями, благодаря чему эндофиты могут передаваться напрямую (Zhang et al. 2022). Эндофитные микроорганизмы растений продуцируют разные вторичные метаболиты, такие как пептиды, флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды, лигнины которые обладают антибактериальной активностью, полезны для профилактики и борьбы с вредителями растений, поэтому они имеют широкие перспективы применения.

Целью данной работы являлось выделение, идентификация и скрининг эндофитных бактерий картофеля по антагонистической активности.

Эндофитные бактерии выделяли из различных частей (глазки, участки под глазками и столоны) трех сортов картофеля Колетте, Радуга, Изабель (первое полевое поколение), выращенных на опытных полях ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН (Казань). Образцы растительного материала тщательно промывали стерильной водой для удаления поверхностных загрязнений. Растительный материал измельчали для извлечения сока, содержащего эндофитные бактерии. Для подготовки серии разведений к соку добавляли 1 мл стерильной воды. Необходимую концентрацию клеток бактерий получали путем кратных разведений, затем методом газона рассевали на поверхность агаризованной среды R2A с использованием шпателя Дригальского. Чашки Петри с посевами инкубировали в термостате при температуре 28 °C. Для выдления чистых культур колонии с разной морфологией рассевали на стерильной среде R2A 3-4 раза. Чистые культуры бактерий хранили при -80 °C. Морфологию бактерий исследовали с помощью светового микроскопа AUSTRIA MC 300 (Австрия). Для быстрой и точной идентификации микроорганизмов использовали MALDI Biotyper. Антагонистическую активность выделенных изолятов эндофитных бактерий в отношении фитопатогенного микромицета исследовали методом блоков *in vitro*.

Из различных частей трех сортов картофеля Колетте, Радуга, Изабель, выращенных на опытных полях выделили и идентифицировали 30 изолятов эндофитных бактерий (таблица 1). В эндосфере сортов Колетте и Изабель доминировали бактерии рода *Enterobacter,* Радуга - *Bacillus* и *Streptomyces.* Бактерии родов *Brevundimonas* и *Stenotrophomonas* встречались и были выделены только из эндосферы сорта Колетте, *Rhizobium* и *Nocardia* - из сорта Радуга, *Ochrobactrum* и *Chryseobacterium* - из сорта Изабель. Показали, что бактерии *Nocardia veterana, Bacillus subtilis* 1*, B. subtilis* 2*, Bacillus megaterium* 4 ингибировали рост фитопатогенного микромицета рода *Fusarium* sp. на 50%, 80%, 84% и 57% соответственно.

Табл. 1 - Эндофитные бактерии разных сортов картофеля

Сорт картофеля	Количество выделенных бактерий	Идентификация по MALDI Biotyper	Score value
Колетте	9	*Brevundimonas vesicularis* *Streptomyces griseus* 1 *Pseudomonas koreensis* *Stenotrophomonas maltophilia* *Streptomyces griseus* 2 *Enterobacter cloacae* 1 *Enterobacter cloacae* 2 *Enterobacter cloacae* 3 *Bacillus subtilis* 1	1.835 1.611 1.768 1.984 1.644 2.139 1.998 2.06 1.680
Радуга	12	*Bacillus atrophaeus* *Enterobacter cloacae* 4 *Rhizobium radiobacter* *Nocardia veterana* *Bacillus megaterium* 1 *Bacillus megaterium* 2 *Bacillus megaterium* 3 *Bacillus megaterium* 4 *Streptomyces griseus 3* *Streptomyces scabiei* *Sphingobacterium multivorum* *Arthrobacter* sp.	1.768 2.19 2.047 1.594 1.611 1.957 1.539 1.719 1.663 1.443 2.143 1.640
Изабель	9	*Ochrobactrum grignonense* *Enterobacter cloacae* 5 *Enterobacter cloacae* 6 *Candida guilliermondii* *Pseudomonas fuscovaginae* *Staphylococcus succinus* *Bacillus subtilis* 2 *Sphingobacterium multivorum* *Chryseobacterium gleum*	2.053 2.424 2.323 2.121 1.328 1.305 1.356 2.143 1.744

Таким образом, показали, что разнообразие эндосферы зависит от сорта картофеля. В дальнейшем планируется проведение сравнительного анализа бактериальных сообществ эндосферы разных сортов картофеля с помощью методов высокопроизводительного секвенирования для более детального исследования. Скрининг эндофитных бактерий картофеля по антагонитической активности позволил отобрать активные изоляты для дальнейшей характеристики.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-76-20010, https://rscf.ru/project/25-76-20010/.

Список литературы:

Zhang J., Islam M.S., Wang J., Zhao Y., Dong W. Isolation of Potato Endophytes and Screening of *Chaetomium globosum* Antimicrobial Genes. Int. J. Mol. Sci. 2022; 21;23(9):4611. doi: 10.3390/ijms23094611.

Khare E., Mishra J., Arora N.K. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. Front. Microbiol. 2018;9:2732. doi: 10.3389/fmicb.2018.02732.

Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M.C., Glick B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Res. Microbiol. 2016;183:92–99. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008.

Репродукция вируса АЧС в клетках свиньи, экспрессирующих химерную прокаспазу -3 с сайтом протеазы Ps273R вируса АЧС

Пильгуй Л.С.[1], Калинин Д.С.[2], Шляпников М.Г.[1], Земскова М.Ю.[1], Грановский И.Э.[1,2]

[1] ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБФМ РАН)
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН
granovsky@pbcras.ru

Ключевые слова: вирус АЧС, химерная каспаза-3, апоптоз, протеаза вируса АЧС pS273R.

Вирусные заболевания животных наносят значительный ущерб животноводству и представляют потенциальную угрозу для человека. Основным методом профилактики вирусных заболеваний животных является вакцинация. Однако разработка новых вакцин весьма трудоемка и не всегда успешна. Выведение пород животных с генетическим иммунитетом к определенным вирусным инфекциям является альтернативным способом защиты от вирусных заболеваний.

Одним из примеров вирусной инфекции, разработка вакцины против которой оказалась сложной задачей, является африканская чума свиней (АЧС). АЧС — контагиозное заболевание домашних свиней и диких кабанов, характеризующееся быстрым прогрессированием и практически 100% летальностью. Вспышки АЧС у домашних свиней чаще всего происходят в Европе и Азии, реже в Африке и Америке. Несмотря на то, что вирус был впервые выявлен в Кении более 100 лет назад, эффективной вакцины против АЧС не существует. Вирус АЧС — это крупный оболочечный ДНК-содержащий вирус, который реплицируется в цитоплазме в так называемых вирусных фабриках. Геном вируса АЧС составляет около 170 – 190 т.п.н. и содержит от 151 до 167 открытых рамок считывания, функции почти половины из которых неизвестны. Вирус АЧС использует различные механизмы уклонения от иммунного ответа, направленные на интерфероновый ответ I типа, апоптоз, воспалительную реакцию и экспрессию специфических генов хозяина, что, вероятно, затрудняет разработку эффективной вакцины против АЧС.

Актуальным является поиск новых противовирусных подходов, нацеленных на наиболее консервативные вирусные элементы, к которым, несомненно, относятся вирусные протеазы. Многие РНК-вирусы и некоторые ДНК-вирусы кодируют собственные протеазы, чья основная функция заключается в процессинге вирусных полипротеинов и предшественников репликативных или структурных белков. Высокая консервативность вирусных протеаз и их участков узнавания позволяет использовать их при разработке противовирусных препаратов на основе синтетических белков, где кодируемые вирусом протеазы служат активаторами противовирусного ответа в инфицированных клетках.

Целью данной работы является исследование возможности использования протеазы pS273R вируса АЧС для активации каспазы-3 и последующую индукцию апоптоза в клетках при вирусной инфекции. Каспаза-3 является ключевым ферментом в запуске апоптотической гибели клетки, после ее активации процесс считается необратимым. Каспаза-3 синтезируется в виде неактивного предшественника - прокаспазы, активация которого происходит в результате ограниченного процессинга клеточными протеазами. Ранее нами была сконструирована химерная прокаспаза-3 свиньи, способная активироваться протеазой pS273R вируса АЧС как *in vitro*, так и в лизатах клеток млекопитающих.

Для определения может ли химерная прокаспаза активироваться при заражении клеток вирусом и вызывать гибель инфицированных клеток, в данной работе была использована уникальная линия иммортализованных клеток селезёнки свиньи (hTert SSs) которая поддерживает полный цикл созревания и реинфекции вируса АЧС. Были получены трансгенные сублинии hTert SSs, экспрессирующие химерную прокаспазу-3 свиньи с сайтом вирусной протеазы pS273R, или её вариант, неспособный активироваться в присутствии вируса. Клетки заражали авирулентным штаммом вируса АЧС (ARRIAH/delta MGF110, Владимир), и репродукцию вируса оценивали по репликации вирусной ДНК (ПЦР в реальном времени) и по цитопатическому эффекту, который указывает на количество инфекционных вирусных частиц. Уровень апоптоза в инфицированных клетках оценивали с использованием набора Аннексин V-AF488 (Люмипроб, Россия). Результаты показали, что несмотря на расщепление химерной прокаспазы в клетках, инфицированных вирусом АЧС и появление химерной каспазы-3, индукция апоптоза не превышает 10% по сравнению с контрольным вариантом. Также не наблюдалось значительного ограничения репликации вирусной

ДНК и количества инфекционных вирусных частиц. Был проведён анализ локализации как химерной прокаспазы-3, так и вирусной протезы в клетках hTert SSs. Показано, что химерная прокаспаза-3 детектируется преимущественно в цитоплазме, в то время как вирусная протеза определяется как в фракции цитоплазматических белков, так и во фракциях мембран-ассоциированных белков. Таким образом отсутствие значимого эффекта в ограничении репродукции вируса, можно объяснить различной компартментализацией этих белков в инфицированных клетках, которая приводит к частичной активации каспазы-3 и, как следствие, неполной индукции клеточной гибели.

Полученные результаты заложили основу для дальнейшей модификации химерной прокаспазы 3 с целью её оптимальной ко-локализации с протеазой pS273R, кодируемой вирусом АЧС.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №122040500033-8.

Свойства нового изолята грамположительной ультрамикробактерии, шт. SLS-3, выделенной из песка прибрежной океанической зоны в Шри-Ланке

Поливцева В.Н.[1], Абашина Т.Н.[1], Звонарёв А.Н.[1], Носков А.Е.[2], Мачулин А.В.[1], Перов Я.А.[2], Шорохова А.П.[1], Сузина Н.Е.[1]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
suzina_nataliya@rambler.ru
[2] Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино

Ключевые слова: ультрамикробактерии, деградация пластика, устойчивость к УФ.

Из образца песка, взятого в прибрежной океанической зоне в Шри-Ланке выделена грамположительная бактерия ультрамелких размеров, которая по морфологическим критериям (средний объём клеток популяции в различных условиях культивирования) может быть отнесена к ультрамикробактериям (Рис. 1а) (1). Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК позволил отнести этот организм к бактериям рода *Microbacterium*, ближайшим филогенетическим родственником которой являются представители вида *Microbacterium paraoxidans*. Экспериментальные исследования проведены с учётом особенностей биотопа, из которого были отобраны пробы песка – это зоны с длительным и высоким уровнем УФ-облучения. Микробиологическими и биохимическими методами и подходами показано, что штамм SLS-3 не обладает значимой антимикробной активностью в отношении широкого спектра модельных грамположительных и грамотрицательных бактерий из лабораторной коллекции авторов исследования. Не была обнаружена способность шт. SLS-3 расти на ряде органических соединений класса фенолов. Показано, что в условиях культивирования на агаризованной среде в открытых чашках под прямым воздействием жёсткого стерилизующего УФ-излучения клетки шт. SLS-3, посеянные жирным штрихом, не росли (визуально не наблюдался рост колонии), но сохраняли жизнеспособность даже после полного высыхания. Клетки в этих условиях характеризовались наличием большого числа вытянутых и ветвящихся форм с просветленной цитоплазмой и цепочками плотных сферических образований внутри. После пересева на богатую питательную среду клетки 1-го пассажа шт. SLS-3, после длительной lag-фазы, реверсировали обратно к характерной кокковидной ультрамелкой форме. Популяция клеток 1-го пассажа проявляла способность к умеренному росту под прямым воздействием жёсткого УФ-излучения.

Методом сканирующей электронной микроскопии изучено влияние экзометаболитов шт. SLS-3 на структуру поверхностного слоя полиэтилентерефталата (ПЭТ) после длительного культивирования в жидкой минеральной среде (2 месяца) (Рис. 1 в-г).

Обнаружено формирование толстой биопленки на поверхности ПЭТ и захват скоплений мелких фрагментов разрушенного пластика в полисахаридный матрикс (Рис. 1 в). В среде культивирования встречается много фрагментов пластика различных размеров в окружении живых клеток (с характерным зелёным свечением при окрашивании реактивом Live/Dead цветом) (Рис. 1б). Обнаружено, что в контрольных вариантах культивирования пластика в минеральной среде без клеток в большом количестве образуются мелкие свободно лежащие плоские частицы пластика разнообразной формы (нанопластик) (Рис. 1г).

Выделенный изолят ультамикробактерии *Microbacterium* sp. шт. SLS-3 из прибрежной океанической зоны проявляет устойчивость к действию УФ, способен образовывать биопленки на поверхности пластика при совместном инкубировании и взаимодействовать с частицами нанопластика, изолируя их путём инкапсулирования в гранулы из матрикса биопленки.

Загрязнение пластиком мирового океана признано одной из самых серьёзных экологических проблем, поэтому исследования в этой области приобретают все большую актуальность (2). Известно несколько примеров организмов, способных к деструкции различных видов пластика, в том числе в 2016 году описана бактерия *Ideonella sakaiensis*, способная к деструкции ПЭТ (3–5). Благодаря способности выделенного изолята одновременно выдерживать действие жесткого УФ и потенциально участвовать в разрушении пластика его дальнейшее изучение является перспективным для дальнейшего биотехнологического применения.

10.24412/cl-37448-2025-1-032-033

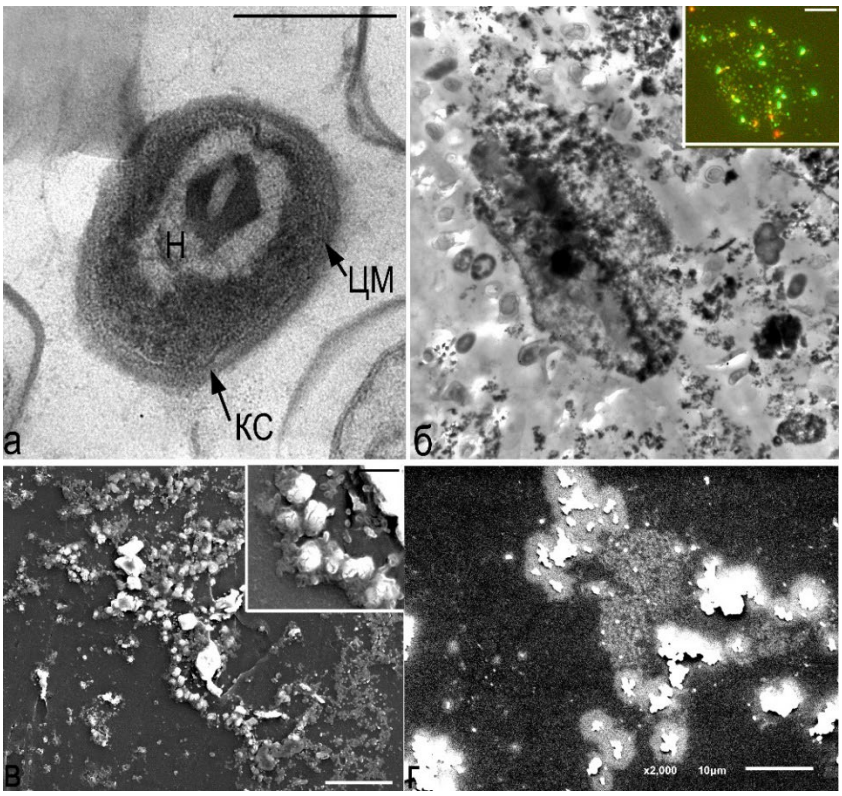


Рис.1 Электронная трансмиссионная ТЭМ (а, б), сканирующая СЭМ (в, г) и световая люминесцентная микроскопия (вставка фрагмента в рис. 1б) клеток нового изолята шт. SLS-3 в различных условиях культивирования. (а) ультратонкий срез клетки шт. SLS-3, выращенной на среде R2A; (б) тонкий срез осадка, полученного центрифугированием жидкой минеральной среды, после инкубации в ней клеток шт.SLS-3 в присутствии пластика в течение 2-х месяцев. (в, г) поверхность пластика после инкубации в течении 2-х месяцев в минеральной среде вместе с клетками шт. SLS-3 (в) и в минеральной среде без клеток (г). Обозначения: КС – клеточная стенка; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; Н – нуклеоид. Длина масштабной метки: (а) – 0,2 мкм; (б) – 2 мкм, на вставке – 5мкм; (в) – 20 мкм, на вставке – 1 мкм.

Список литературы:

1. Duda V. I., Suzina N.E., Boronin A.M. Ultramicrobacteria. eLS. 2020.
2. Fonseca T., Agostinho F., Pavão J.M.S.J., Sulis F., Maceno M.M.C., Almeida C.M.V.B., Giannetti B.F., Marine plastic pollution: A systematic review of management strategies through a macroscope approach, Marine Pollution Bulletin, Volume 208, 2024, 117075, https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.117075.
3. Tanasupawat S., Takehana T., Yoshida S., Hiraga K., Oda K. *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). Int J Syst Evol Microbiol. 2016 Aug;66(8):2813-2818. doi: 10.1099/ijsem.0.001058. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27045688.
4. Meng Q., Yi X., Zhou H., Song H., Liu Y., Zhan J., Pan H. Isolation of marine polyethylene (PE)-degrading bacteria and its potential degradation mechanisms, Marine Pollution Bulletin, Volume 207, 2024, 116875, https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116875.
5. Atanasova N., Stoitsova S., Paunova-Krasteva T., Kambourova M. Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(11):5610. https://doi.org/10.3390/ijms22115610.

Климатические и антропогенные факторы формирования городского аэробиома: сравнительный анализ бактерий и металлов в PM10 Москвы, Мурманска и Рима

Сазонова О.И., Иванова А.А., Ветрова А.А.

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

Ключевые слова: PM10, бактериальные сообщества, металлы, экологические сети.

Для функционирования биологических систем и сохранения равновесия в биохимических процессах крайне важна атмосфера, свободная от вредных примесей. В пределах крупных городских агломераций за счет смешивания многочисленных поллютантов происходит значительное увеличение концентраций опасных соединений в атмосфере, тем самым усложняя условия для жизни обитателей различных экосистем. Одними из таких загрязнителей в атмосферном аэрозоле являются твердые частицы (Particulate Matter – PM), в состав которых входят как биогенные, так и абиогенные компоненты.

В данной работе проведен сравнительный анализ бактериальных сообществ, связанных с атмосферными частицами PM10 (размер частиц 10 мкм и менее), в трех городах – Москве, Мурманске и Риме, находящихся в различных климатических поясах. Исследование базируется на едином протоколе отбора проб, сочетая интеграцию таксономического, функционального и сетевого анализа аэробиомов, а также оценку содержания водорастворимых и нерастворимых металлов методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS).

Показано, что климатический пояс является определяющим фактором для структуры и разнообразия аэромикробиоты, однако уровень урбанизации, сезонность и уровень загрязнения также оказывают значимое влияние. В Риме наблюдается максимальное альфа-разнообразие микробиоты летом и осенью, с выраженной сезонной динамикой, тогда как в Москве и Мурманске изменение бактериального сообщества ограничено суровыми климатическими условиями. Основные бактериальные таксоны различаются: так на уровне рода в Риме доминируют *Sphingomonas* и *Chryseoglobus*, в Москве – представители кишечной микробиоты (*Faecalibacterium*, *Prevotella*), а в Мурманске – холодоустойчивые группы, такие как *Frigoribacterium* и *Polaromonas*. Интегративный анализ показал различия в организации экологических сетей аэробиомов, отражая специфику местных условий. В Риме группа аэробных хемогетеротрофов, денитрификаторов и метилотрофов наиболее представлена, в Москве и Мурманске усиливается роль бактерий-деструкторов углеводородов и пластика.

Проведена корреляция между содержанием отдельных металлов (Zn, Mn, Al, Be и др.) и распространением ряда бактериальных родов. При этом данное загрязнения оказалось не ключевым фактором формирования аэробиомов, за исключением отдельных случаев. Общее влияние на структуру бактериального сообщества на уровне функционального зонирования городов (трафик, жилая, рекреационная зоны) невелико, однако наблюдается изменение распространенности специфичных таксонов, таких как *Blastococcus, Noviherbaspirillum, Sphingomonas*.

Результаты работы расширяют знания о влиянии климата, урбанизации и химического состава аэрозолей на формирование микробных сообществ атмосферы. Полученные результаты служат основой для развития систем биомониторинга качества воздуха и оценки экологических рисков на урбанизированных территориях, демонстрируя роль природных и антропогенных факторов в организации бактериальных взаимодействий. Впервые показаны сезонные, климатические и антропогенные различия в составе бактериальных аэробиомов на межрегиональном уровне, что создаёт платформу для дальнейших комплексных исследований городской микробиоты и факторов её формирования.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (Госзадание №FMRM-2022-0014).

Влияние доступа кислорода на микробиоту и запах навозных стоков

Хето М.Х.[1], Ашихмина Т.Я.[1,2]

[1]Вятский государственный университет, Киров
[2] Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар
ecolab2@gmail.com

Ключевые слова: навозные стоки, аэрация, микробиота, санитарные показатели.

Функционирование крупных животноводческих комплексов приводит к значительному и многофакторному воздействию на окружающую среду, включая загрязнение прилегающих территорий санитарно-показательными микроорганизмами (МО) [1]. Основным источником соответствующих МО являются побочные продукты животноводства (ППЖ), в частности навоз и навозные стоки (НС), которые после специальной обработки (обеззараживания) вносят в пашню в качестве органических удобрений [2]. Для снижения биологической опасности ППЖ на большинстве предприятий применяют технологию, включающую разделение НС на жидкую (ЖФ) и твердую (ТФ) фракции с последующим выдерживанием ТФ на специальных площадках, а ТФ в лагунах. Соответствующая технология приводит к снижению нагрузки ППЖ опасными МО, гельминтами и яйцами гельминтов за счет протекания естественных биологических процессов [3]. Для обеззараживания ЖФ используют лагуны открытого или закрытого типа. Анаэробная среда закрытых лагун способствует микробиологическому разложению органических соединений с образованием большого количества запахообразующих веществ (ЗОВ) [4,5]. Открытые лагуны характеризуются свободным доступом кислорода к поверхностным слоям ЖФ и быстрым снижением концентрации O_2 с увеличением глубины. Наличие кислорода стимулирует развитие аэробной микробиоты, участвующей в окислительной деструкции ЗОВ до продуктов, не имеющих запаха. Для активации соответствующих процессов используют прием аэрации содержимого лагун с помощью соответствующего оборудования. В открытых, крытых и аэрируемых лагунах формируются разные условия для жизнедеятельности аэробной и анаэробной микробиоты, что может отразиться на санитарных характеристиках НС.

Цель работы – изучить влияние аэрации на микробиоту и санитарные показатели жидкой фракции навозных стоков.

Для проведения исследований использовали ЖФ свиных НС. Пробы отбирали в стерильные пятилитровые емкости сразу после сепарирования и доставляли в лабораторию для выполнения исследований. Варианты эксперимента: 1 – ЖФ в условиях естественного доступа кислорода; 2 – анаэробные условия хранения ЖФ; 3 – ЖФ в условиях аэрации. Для аэрации применяли воздушный регулируемый компрессор с керамическими распылителями. Расход воздуха для аэрации – 10 л/час на каждый литр ЖФ. Продолжительность эксперимента – 2 недели. Температура в лабораторном помещении во время эксперимента находилась в пределах 19±1°С. Микробиологические исследования проб выполняли в специализированной лаборатории согласно действующим методикам. Пробы ЖФ для микробиологического анализа отбирали с глубины 10 см от поверхности. Эксперимент проводили в трех повторах. Статистическую обработку результатов выполняли общепринятыми методами.

Согласно полученным результатам, доминирующее положение по численности (~10^7 КОЭ/мл) во всех вариантах эксперимента занимали бактерии *Clostridium ssp., Bifidobacterium* ssp. и *Lactobacillus* ssp. Статистически значимых различий по данному показателю между различными вариантами не выявлено. Количество жизнеспособных бактерий *Candida* sp., *Proteus* ssp., *Prevotella* sp., *Bacteroides* sp., *Sarcina ventriculi, Aspergillus* ssp. во всех вариантах находилась на уровне ~10^6 КОЭ/мл.

Анаэробные условия способствовали выживанию *Enterococcus* sp., *Veillonella parvula, Acidaminococcus fermentans,* которые были выявлены только в варианте № 2 в количестве (3,4±0,3)*10^5 КОЭ/мл. Кроме того, в варианте № 2 наблюдали более высокую численность *Fusobacterium sp.*, чем в других вариантах. Хорошая выживаемость условно-патогенных *Enterococcus* в анаэробных условиях, характерных для крытых лагун, вызывает определенную тревогу, поскольку данные бактерии относятся к возбудителям опасных внутрибольничных

инфекций, проявляют высокую резистентность к антибиотикам и могут служить фактором передачи генов антибиотикорезистентности обитающим в природных средах МО.

Прием аэрации привел к некоторому снижению численности *Escherichia coli* в варианте №3 относительно других вариантов (с ~10^6 до ~10^5 КОЭ/мл), однако данные МО относятся к нормальным обитателем кишечника человека и большинства животных и обычно не представляют значительной опасности для ОС.

Жизнеспособные гельминты и яйца гельминтов в пробах ЖФ выявлены не были.

Выводы: Обезвреживание ЖФ навозных стоков в крытых лагунах может способствовать выживанию и активному развитию анаэробной микробиоты, включая некоторые условно-патогенные МО. Протекающие в анаэробных условиях микробиологические процессы разложения органических веществ приводят к накоплению соединений, обладающих крайне непрятным запахом. Эмиссия соответствующих веществ в атмосферу в период откачивания ЖФ из лагун вызывает запаховое загрязнение воздуха. Соответствующий факт следует учитывать при проектировании систем хранения и обработки ППЖ.

Аэрация ЖФ с помощью специальных устройств не оказывает существенного влияния на состав санитарно-показательных МО. В условиях принудительной аэрации хорошо выживают даже такие облигатные анаэробы, как *Bacteroides* sp. и *Fusobacterium sp.*, что снижает целесообразность использования данного приема для улучшения санитарных характеристик обрабатываемых НС. Вместе с тем аэрация снижает опасность формирования плотного осадка на дне лагун и способствует развитию аэробной микробиоты, активно минерализующей органические вещества, что снижает эмиссию запахообразующих веществ в атмосферный воздух.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме «Оценка состояния трансформированных экосистем подзоны южной тайги, методические подходы к их биоремедиации», номер государственной регистрации в ЕГИСУ № 125021402208-5.

Список литературы:

1. *Сырчина Н.В., Пилип Л.В, Колеватых Е.П., Ашихмина Т.Я*. Биологическое загрязнение почв побочными продуктами животноводства // Теоретическая и прикладная экология. 2024. № 2. С. 201–210.
2. *Сырчина Н.В., Пилип Л.В, Колеватых Е.П., Ашихмина Т.Я*. Влияние различных способов обработки на численность бактерий рода Clostridium (Clostridia, Bacteria) в побочных продуктах животноводства // Поволжский экологический журнал. 2023. № 4. С. 466–480.
3. *Пилип Л.В., Сырчина Н.В.* Проблема запахового загрязнения атмосферного воздуха животноводческими объектами // Вестник Совета молодых ученых Рязанского государственного агротехнологического университета имени П.А. Костычева. 2023. № 2(18). С. 9–15.
4. *Сырчина Н.В., Пилип Л.В., Ашихмина Т.Я*. Основные подходы к снижению запахового загрязнения окружающей среды предприятиями животноводства (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2024. № 3. С. 6–19.
5. Пилип Л.В., Сырчина Н.В. Технологии контроля запаха в условиях животноводческих предприятий // Вестник Вятского ГАТУ. 2025. № 1(23). С. 103–113.

Чувствительность к антибиотикам непатогенных изолятов из сточных вод производства аквакультуры

Холодова А.А., Герасимчук А.Л.

Национальный исследовательский Томский государственный университет
(Биологический институт)
nsty.kh2003@gmail.com

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, культивируемые изоляты из сточных вод, биотехнологический потенциал.

Исследование антибиотикочувствительных непатогенных микроорганизмов из сточных вод аквакультуры представляет высокую значимость, потому как данные экосистемы служат ключевыми точками отбора резистентных штаммов. Их мониторинг позволяет оценить риск переноса этих генов к патогенам, что необходимо для сохранения эффективности противомикробных препаратов (Watts J. E. M. et al., 2017). Целью исследования явилось изучение чувствительности к различным противомикробным препаратам широкого и узкого спектра действия штаммов *Exiguobacterium* sp. S1, *Bacillus* sp. S6, *Alcaligenes* sp. S12, *Tistrella* sp. S22, *Lysinibacillus* spp. S24, S23, выделенных нами ранее из сточных вод, образуемых производством по выращиванию креветок на территории Индонезии (Герасимчук и др., 2025). Проверяли чувствительность изолятов к антибиотикам, относящимся к группам пенициллинов, цефалоспоринов, фторхинолонов, полимиксинов, сульфаниламидов, тетрациклинов, амфениколов, аминогликозидных и β-лактамных антибиотиков, макролидов. Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли на агаризованной питательной среде ГРМ (Оболенск, Россия) диско-диффузным методом в соответствии с инструкцией производителя (ООО «Русбиофарм», Россия).

На основании анализа близкой к полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК была определена филогенетическая принадлежность исследуемых культивируемых изолятов из сточных вод. Отобранные для исследования изоляты не относятся к патогенным микроорганизмам и представляют интерес с точки зрения потенциального биотехнологического применения.

Для штамма S1 показано сходство с близкородственными бактериальными видами *Exiguobacterium arabatum* и *Exiguobacterium qingdaonense* (Герасимчук и др., 2025). Изоляты *Exiguobacterium* обладают способностью стимулировать рост растений. Последовательности геномов различных штаммов этого рода показали наличие множества генов, кодирующих продукты, важные для окружающей среды, которые могут применяться в промышленности для производства ферментов и разложения токсичных веществ (Kasana R.C., Pandey C.B., 2018).

Для штамма S6 ближайшими родственными видами явились *Bacillus aerius*, *B. aerophilus* и *B. altitudinis*. Изоляты S23 и S24 показали высокую степенью гомологии гена 16S рРНК с *Lysinibacillus odysseyi* (Герасимчук и др., 2025). Многие представители рода *Bacillus* обладают широким метаболическим потенциалом и используются в разнообразных биотехнологиях. Некоторые штаммы *Lysinibacillus* и *Bacillus* устойчивы к тяжелым металлам, а также способны к их биоаккумуляции. Эти микроорганизмы можно рассматривать в качестве перспективных объектов для биоремедиации экосистем, загрязненных металлами (Raja C.E., Omine K., 2012).

Штамм S12 показал высокую степень сходства по гену 16S рРНК с близкородственными видами *Alcaligenes aquatilis* и *A. parafaecalis*. Бактерии рода *Alcaligenes* демонстрируют значительный биотехнологический потенциал благодаря своей способности к деградации токсичных ароматических соединений и их преобразованию в ценные биопродукты, такие как биоразлагаемые полимеры (полигидроксиалканоаты), и биоэнергию (Pagliano G. et al., 2017).

Ближайшим родственным видом для штамма S22 явился *Tistrella mobilis* (продуцент дидемнинов - циклических депсипептидов, которые обладают противоопухолевыми, противовирусными и иммуносупрессивными свойствами).

Штаммы *Exiguobacterium* sp. S1 и *Lysinibacillus* sp. S23 показали чувствительность ко всем исследованным антимикробным препаратам, за исключением резистентности к триметаприму/сульфаметоксазолу (25 мкг) штамма S1 и к азтреонаму (30 мкг) штамма S23.

Штаммы *Bacillus* sp. S6 и *Lysinibacillus* sp. S24 также оказались чувствительны к большинству противомикробных препаратов. Штамм S6 был устойчив к цефтазидиму (30 мкг) и фосфомицину (200 мкг), штамм S24 – к триметаприму/сульфаметоксазолу (25 мкг) и к азтреонаму (30 мкг).

Устойчивость к наибольшему количеству исследуемых препаратов, относящихся более чем к трём разным группам антибиотиков, показали штаммы *Alcaligenes* sp. S12 и *Tistrella* sp. S22. На таком основании эти микроорганизмы можно считать полирезистентными.

Чтобы успешно развивать биотехнологии и сдерживать рост антибиотикорезистентности, необходимо оценивать чувствительность к антибиотикам у промышленных штаммов, в том числе у тех, что выделены из сточных вод и других отходов. Таким образом, исходя из полученных результатов, важно с осторожностью использовать такие высокоустойчивые штаммы, как S12 и S22, в экологических и сельскохозяйственных биотехнологиях, а также учитывать устойчивость к разным антибиотикам остальных штаммов при возможном их комбинировании при разработке комплексных биопрепаратов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2024-0006).

Список литературы:

1. Watts J. E. M. et al. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions //Marine drugs. – 2017. – Т. 15. – №. 6. – С. 158.
2. Герасимчук А.Л., Воробьев Д.С., Трифонов А.А., Косов А.В., Ивасенко Д.А. Изучение разнообразия культивируемых бактерий, выделенных на селективных питательных средах из сточных вод производства аквакультуры в Индонезии // 5-й Российский микробиологический конгресс : сборник тезисов докладов ; Волгоград, 29 сентября – 3 октября 2025 г. / под ред. Д. А. Бабкова. – Волгоград : Библиотечно-издательский центр ВолгГМУ, 2025. С. 176
3. Kasana R. C., Pandey C. B. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture //Critical reviews in biotechnology. – 2018. – Т. 38. – №. 1. – С. 141-156.
4. Raja C. E., Omine K. Characterization of boron resistant and accumulating bacteria *Lysinibacillus fusiformis* M1, *Bacillus cereus* M2, *Bacillus cereus* M3, *Bacillus pumilus* M4 isolated from former mining site, Hokkaido, Japan //Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2012. – Т. 47. – №. 10. – С. 1341-1349.
5. Pagliano G. et al. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes // Biotechnology for biofuels. – 2017. – Т. 10. – №. 1. – С. 113.

СЕКЦИЯ 2
Биохимия, физиология и молекулярная биология микроорганизмов

Metagenomic insights into the diversity of *Aquificaceae* from the Tamdykul geothermal spring, Tajikistan

Dzhuraeva M.M. [1,2]***, Birkeland N.-K.*** [2]***, Bobodzhanova Kh.I.*** [1]

[1]Center of Biotechnology of the Tajik National University, Dushanbe,
[2]Department of Biological Sciences, University of Bergen, Bergen
dmunavvara@bk.ru

Keywords: metagenomics, thermophilic bacteria, *Aquificaceae*, geothermal springs, Tajikistan.

Metagenomic exploration of geothermal ecosystems has significantly broadened our understanding of microbial diversity and enabled the discovery of novel thermostable enzymes with considerable potential for industrial applications.

In this study, we present findings from the Tamdykul geothermal spring (2198 m asl; 39°25.102′ N, 71°13.103′ E), located in Tajikistan. The outlet water temperature was 88°C, with a pH of 7.4 and a conductivity of 1,019 µS/cm. Chemical analysis revealed the following major ion composition: Na^+ (179.5 ppm), Si (50.0 ppm), K^+ (7.5 ppm), Ca^{2+} (3.8 ppm), SO_4^{2-} (193.2 ppm), and Cl^- (35.1 ppm) [1].

Water samples were collected in sterile 5 L containers, sequentially filtered through 1.2 µm and 0.2 µm membranes, preserved in RNAlater, washed with 0.85% NaCl, and processed for DNA extraction using the DNeasy PowerSoil Kit. Shotgun metagenomic sequencing was performed at Eurofins Genomics using the Illumina NovaSeq 6000 platform (PE150). Sequence reads were quality-filtered, assembled, and binned using CLC Genomics Workbench v22. Metagenome-assembled genomes (MAGs) quality and taxonomic placement were assessed using CheckM and GTDB-Tk [2], with annotation via NCBI PGAP and RAST [3]. Phylogenetic analyses of 16S rRNA genes and predicted proteomes were conducted in MEGA X and the Type (Strain) Genome Server, respectively [4].

The metagenomic dataset yielded six near-complete metagenome-assembled genomes. The dominant lineages belonged to the families *Thermaceae* (41.2%), *Aquificaceae* (19.7%), and *Halothiobacillaceae* (18.1%). Additional low-abundance taxa included *Schleiferia thermophila* (1.6%), *Pyrobaculum* (1.2%), and members of the *Desulfurococcaceae* (0.7%).

Aquificaceae is a family of thermophilic bacteria that thrive in extreme environments such as hot springs, hydrothermal vents, and other geothermal habitats. Belonging to the phylum *Aquificae*, these microorganisms are known for their ability to survive and grow at very high temperatures, often exceeding 80°C.

Members of the *Aquificaceae* family are chemolithoautotrophs, meaning they obtain energy by oxidizing inorganic substances like hydrogen or sulfur compounds and use carbon dioxide as their carbon source. This allows them to play a crucial role in primary production in ecosystems where sunlight is limited or absent. The bacterial phylum *Aquificae* includes two main orders: *Aquificales*, which consists of the families *Aquificaceae* and *Hydrogenothermaceae*, and *Desulfurobacteriales*, which includes the family *Desulfurobacteriaceae* [5]. These bacteria are commonly found in hot environments such as terrestrial and marine hydrothermal systems across the globe.

Due to their unique metabolic pathways and extreme heat tolerance, *Aquificaceae* are of great interest to microbiologists and evolutionary biologists. They are considered among the most ancient and primitive lineages of bacteria, providing valuable insights into the early evolution of life on Earth.

One of the MAGs (MAG007) was composed of 1.4 Mbp distributed across 136 contigs, with an average GC content of 43.3%. It showed an estimated completeness of 88.2% and a contamination of 1.22%. Phylogenetic analysis placed it branching between known *Aquificaceae* lineages. Meanwhile, MAG007 exhibited a 98.84% average nucleotide identity (ANI) with its closest known relative, but the digital DNA–DNA hybridization (dDDH) value was also only 18,7%, suggesting that despite high similarity, it may still represent a distinct species.

Metagenomic analysis of the Tamdykul geothermal spring revealed a highly diverse thermophilic microbial community dominated by members of the families *Thermaceae*, *Aquificaceae*, and *Halothiobacillaceae*. These taxa represent key functional groups within high-temperature ecosystems,

contributing to biogeochemical cycling and primary production in extreme environments. The recovery of six near-complete MAGs, including one (*MAG007*) affiliated with the family *Aquificaceae*, highlights the presence of potentially novel thermophilic lineages.

The genomic and phylogenetic characterization of *MAG007* indicates close but distinct evolutionary relationships with known *Aquificaceae* species, suggesting that it may represent a new species adapted to the physicochemical conditions of the Tamdykul spring. These findings not only expand our understanding of microbial diversity in Central Asian geothermal systems but also provide a valuable resource for the discovery of novel thermostable enzymes with potential biotechnological applications.

Overall, this study demonstrates the power of metagenomic approaches in uncovering the hidden microbial and genetic diversity of geothermal environments and underscores the ecological and evolutionary significance of thermophilic microorganisms inhabiting extreme niches.

Acknowledgments

This research was funded by the Eurasia Program of the Norwegian Directorate for Higher Education and Skills (HK-dir) (CPEA-LT-2017/10061).

References

1. Dzhuraeva M, Bobodzhanova K, Birkeland N-K. The metagenomic landscape of a high-altitude geothermal spring in Tajikistan reveals a novel *Desulfurococcaceae* member, *Zestomicrobium tamdykulense* gen. nov., sp. nov. MicrobiologyOpen. 2024 Oct; 13(5):e70004. Doi: 10.1002/mbo3.70004. PMID: 39390720; PMCID: PMC11467010.

2. Parks D. H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A. J., Chaumeil P. A., & Hugenholtz P. GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank-normalized and complete genome-based taxonomy. Nucleic Acids Research, 2022. 50(D1), D785–D794. 10.1093/nar/gkab776

3. Aziz R. K., Bartels, D., Best A. A., DeJongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Zagnitko O. The RAST server: Rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics, 2008. 9, 75. 10.1186/1471-2164-9-75

4. Meier-Kolthoff J. P. & Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. Nature Communications, 2019. 10(1), 2182. 10.1038/s41467-019-10210-3

5. Gupta, R.S. The Phylum *Aquificae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_119.

Энергетические аспекты в ответе грибов и дрожжей на стрессовые воздействия

Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

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

Ключевые слова: дыхательная цепь, альтернативная оксидаза, АТФ, АДФ, АМФ, цАМФ, нергетический заряд.

В природных экосистемах микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Выживание и конкурентоспособность по отношению к другим видам обеспечивается «запуском» специальных механизмов, действие которых может включать индукцию новых ферментов, а также синтезом защитных или сигнальных метаболитов.

Исследование адаптационных механизмов у микроорганизмов особенно актуально, поскольку именно в стрессовых условиях они способны осуществлять процессы, важные для человека, такие как детоксикация вредных химических соединений, а также синтез различных вторичных биологически активных метаболитов (антибиотиков, токсинов, пигментов и др.).

Выживаемость в стрессовых условиях в первую очередь определяется энергетическим статусом клетки. Как известно, основной путь получения энергии в доступной для клетки форме у грибов и аэробных дрожжей связан с переносом электронов по цитохромной дыхательной цепи. Энергетические аспекты адаптации до сих пор остаются недостаточно изученными.

Влияние стрессоров на клетки прямо или косвенно связано с образованием активных форм кислорода (АФК), действие которых в конечном итоге приводит к снижению скорости роста микроорганизма. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что одной из мишеней для действия АФК являются митохондрии и, в частности, дыхательная цепь. АФК вызывают перекисное окисление фосфолипида - кардиолипина, который абсолютно необходим для активности цитохромоксидазы. Кроме того, АФК могут непосредственно инактивировать переносчики электронов по дыхательной цепи, АТФазу, трансгидрогеназу и другие белки.

Литературные данные также свидетельствуют о том, что действие стрессоров приводит к заметной стимуляции генетической активности клеток, в результате чего наблюдается появление стрессовых белков, участвующих в защите клеток от летального действия АФК. Стресс-индуцируемые белки имеют митохондриальную локализацию, что также указывает на участие митохондрий в ответе клеток на действие стрессоров.

Если принять во внимание, что один вид стресса способен индуцировать развитие устойчивости к другим стрессовым воздействиям, можно предположить наличие общего фактора, контролирующего запуск определённых защитных механизмов.

Оказалось, что действие стресс-факторов приводит к снижению содержания адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ И АМФ). Необходимо также отметить заметное снижение внутриклеточного содержания цАМФ, одной из основных сигнальных молекул.

Уровень цАМФ в клетке определяется соотношением активностей аденилатциклазы (синтез цАМФ) и фосфодиэстеразы (распад цАМФ). Можно полагать, что увеличение уровня цАМФ в первые минуты после воздействия на клетки каждого из используемых стрессоров обусловлено увеличением активности аденилатциклазы, после чего в клетках происходит снижение внутриклеточного pH, что приводит к падению активности аденилатциклазы и стимуляции фосфодиэстеразы. Именно снижение концентрации цАМФ (сигнального нуклеотида) как негативного фактора транскрипции у грибов приводит к активации защитных механизмов.

С помощью ингибиторного анализа установлено, что одним из компонентов сложного адаптивного ответа является включение альтернативного пути переноса электронов - цианидрезистентного дыхания (альтернативной оксидазы). Альтернативная оксидаза ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне убихинона и непосредственно переносит на кислород восстановительные эквиваленты от комплекса I (эндогенная НАДН-дегидрогеназа) и комплекса II (экзогенная НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, глицерофосфат-дегидрогеназа) в обход основной дыхательной цепи. Установлено, что альтернативная оксидаза локализована во

внутренней мембране митохондрий и актививируется АМФ. АМФ-связывающий компонент альтернативной оксидазы расположен с внутренней стороны внутренней мембраны митохондрий.

Альтернативная оксидаза может выполнять функцию единственной терминальной оксидазы, обеспечивающей рост гриба в условиях нарушения переноса электронов по основному цитохромному пути. Основная функция альтернативной оксидазы состоит в поддержании окислительной активности клеток, сохраняя способность к синтезу АТФ в первом пункте сопряжения на уровне эндогенной НАДН-дегидрогеназы.

Альтернативная оксидаза может присутствовать в митохондриях наряду с основной, цитохромной, дыхательной цепью. Однако цианид-резистентный путь окисления не способен конкурировать за электроны с основной цитохромной дыхательной цепью, а переносит на кислород только избыточные восстановительные эквиваленты**.**

В качестве адаптивного ответа у дрожжей и грибов происходит одновременное увеличение активностей ферментов, непосредственно или косвенно участвующих в детоксикации активных форм кислорода (АФК): каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы.

Кроме того, в стрессовых условиях происходит синтез различных вторичных метаболитов (нафтохиноновых пигментов, пептидов с антимикробными свойствами и др.).

Таким образом, при адаптации к стрессовым воздействиям энергетический статус грибов и дрожжей благодаря наличию альтернативной оксидазы является достаточным для поддержания выживаемости и биосинтеза вторичных метаболитов.

Список литературы:

1. Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г. Комплексный ответ дрожжей yarrowia lipolytica на стрессовые воздействия. История науки и техники. 2020. № 11. с. 52-59.
2. Synthesis of extracellular l-lysine-α-oxidase along with degrading enzymes by trichoderma cf. aureoviride rifai vkm f-4268d: role in biocontrol and systemic plant resistance A. Arinbasarova, A. Botin, A. Medentsev et al J. Fungi, 2024, 10, 323. https://doi.org/10.3390/jof10050323.

Комплексная характеристика штамма *Pseudomonas* sp. VD9 – перспективного деструктора углеводородов, продуцирующего экзополисахаридную капсулу

Баукова А.С.[1], Ветрова А.А. [1], Сузина Н.Е. [1], Автух А.Н. [1], Церфас М.О.[2], Делеган Я.А.[1,3]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино
[2] ФГБУН ВО Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва
[3]Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет Ростов-на-Дону
baukova_26@mail.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas*, биодеградация, микроорганизмы-деструкторы, анализ генома, секвенирование, жирно-кислотный профиль, капсула, экзополисахариды.

Загрязнение окружающей среды поллютантами является глобальной экологической проблемой. Наиболее распространенными поллютантами, попадающими в окружающую среду, являются алифатические и ароматические углеводороды, а также тяжелые металлы. Эти компоненты обладают низкой химической реакционной способностью, в связи с чем, трудно разлагаются. Способность микроорганизмов к деструкции загрязняющих веществ остается наиболее актуальной темой нынешних биотехнологических исследований, направленных на ремедиационные мероприятия.

Pseudomonas – это разнообразный и сложный род бактерий, который занимает множество ниш и сред обитания. Они известны своей метаболической гибкостью и разнообразием генетических структур, что обуславливает их высокий потенциал как деструкторов углеводородов. Помимо прочего для бактерий рода *Pseudomonas* характерна способность к продукции экзополисахаридов (ЭПС), вовлеченность которых в процессы детоксикации экосистем от загрязняющих веществ не достаточна изучена, что делает представителей данного рода интересными объектами исследования.

Целью работы является комплексная характеристика физиологических и генетических особенностей штамма *Pseudomonas* sp. VD9, а также изучение внеклеточной капсулы, продуцируемой данным микроорганизмом-деструктором алифатических и ароматических углеводородов.

Штамм *Pseudomonas* sp. VD9 был выделен из образца нефтезагрязненного чернозема методом накопительного культивирования. На твердых питательных средах штамм VD9 образует круглые, блестящие колонии с выпуклым профилем и ровным краем, светло-бежевого цвета. Микроскопический анализ популяции клеток исследуемого штамма с использованием световой микроскопии в режиме фазового контраста показал, что клетки имеют палочковидную форму, приблизительно 2 мкм в длину.

Идентификация штамма VD9 была выполнена на основании последовательности полного генома. Филогенетический анализ с использованием геномов типовых штаммов родственных псевдомонад показал, что штамм VD9 находится в кладе с типовыми штаммами видов *P. fildesensis*, *P. extremaustralis*, *P. violetae*, *P. veronii* и *P. paraveronii*, однако не образует кластер ни с одним из перечисленных видов. Согласно результатам расчёта параметров ANI и DDH с типовыми штаммами ближайших родственных видов (Таблица 1), штамм VD9 достоверно не относится ни к одному из них, поскольку параметры ANI и DDH не превышают пороговых значений (95% и 70%, соответственно).

Профиль жирных кислот штамма VD9 качественно сильно отличался от жирно-кислотного состава близкородственных штаммов *Pseudomonas.* Основными жирными кислотами (> 10%) у *Pseudomonas* sp. VD9 были C16:1ω9 (29,5%), C16:0 (20,4%), C18:1ω9 (17,9%) и 9,10Me-C16:0 (14,1%).

Геном штамма *Pseudomonas* sp. VD9 представлен единственной кольцевой хромосомой размером 7 205 777 п. н. (GC% 60,3) и не содержит плазмид (CP169288). В общей сложности геном штамма содержит 6701 ген, включая 6614 кодирующих последовательностей (CDS) и 87 генов РНК

(5S – 6, 16S – 5, 23S – 5, тРНК – 67 и некодирующих РНК – 4). Также было идентифицировано 859 псевдогенов. Из 6614 CDS 3383 (51,1%) были функционально аннотированы.

Табл. 1 – Значения параметров ANI и DDH между геномом штамма VD9 и геномами типовых штаммов родственных видов *Pseudomonas*

Штамм и номер в Genbank	Параметр ANI, %	Параметр DDH, %
P. fildesensis KG01^T (LFMW01)	88,5	57,1
P. extremaustralis DSM 17835^T (VFET01)	88,1	52,1
P. violetae TNT11^T (JAKNRW01)	88,9	47,6
P. veronii DSM 11331^T (JYLL01)	89,0	57,1
P. paraveronii V3/K/3/5^T (CAVMKF01)	88,6	53,1

В геноме штамма *Pseudomonas* sp. VD9 был идентифицирован набор генов, ответственных за деградацию как ароматических, так и алифатических углеводородов и их производных, что согласуется с результатами физиологической характеристики штамма. *Pseudomonas* sp. VD9 способен утилизировать нафталин, *н*-декан, салицилат, катехол, бензоат и ацетат калия с использованием данных соединений в качестве единственного источника углерода и энергии. Оценка эффективности штамма VD9 как деструктора углеводородов показала, что наиболее эффективно штамма VD9 утилизирует нафталин (69,7% за 72 ч), чем *н*-декан (25,9% за 77 ч).

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов клеток *Pseudomonas* sp. VD9, фиксированных в присутствии рутениевого красного в процессе глутар-осмиевой фиксации, было установлено, что клетки штамма формирует обширную капсулярную структуру фибриллярной природы. Способность штамма синтезировать капсулы не зависела от химической природы используемого источника углерода. Так при росте штамма VD9 на ацетате калия и на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии толщина фибриллярной капсулы составляет порядка 500 нм и отличается плотно упакованными интенсивно контрастированными фибриллами с высокой электронной плотностью за счет их связывания с положительно заряженным ионами рутениевого красного. В условиях роста на *н*-декане также наблюдалось формирование развитой фибриллярной капсулы. При этом в структуре капсулы обнаруживались некоторые отличия: вблизи поверхности клеток обнаруживались хаотично распределенные глобулярные частицы размером 50-80 нм каждая. Эти структурные особенности капсулы сохранялись даже в том случае, когда *н*-декан вносили в отросток колбы для предотвращения прямого контакта между клетками и субстратом.

Методом тонкослойной хроматографии материала капсулы, подвергнутого гидролизу в кислой среде, в составе капсулы были определены рамноза и глюкоза. В геноме штамма также были обнаружены гены, вовлеченные в синтез экзополисахаридов, в том числе и гены *alg* и *psl*, которые кодируют ферменты, ответственные за синтез биоплёнок у псевдомонад и *rml* – оперон, участвующий в превращении глюкозо-1-фосфат в L-рамнозу.

Таким образом, штамм *Pseudomonas* sp. VD9 является представителем нового вида рода *Pseudomonas*. Геном штамма представлен единственной хромосомой, на которой локализованы гены катаболизма алифатических и ароматических углеводородов, а также синтеза экзополисахаридов. Штамм VD9 продуцирует фибриллярную капсулу с доминированием рамнозы и глюкозы, сохраняющую структурную организацию при росте на различных углеродных субстратах. Функции этих структур требует уточнения.

Влияние дефицита фосфора на физиологическое состояние авто и миксотрофных культур *Chlamydomonas reinhardtii*

Богданова Е.М.[1,2], Пузанский Р.К.[1,2], Сеник С.В. [1,] Котлова Е.Р.[1]

[1]ФГБУН Ботанический институт имени В.Л. Комарова
Российской академии наук (БИН РАН),
[2]ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет
(СПбГУ)
EBogdanova@binran.ru
bogdanova.ekaterina15@gmail.com

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, дефицит фосфора, физиология, рост, адаптация

Фосфор — жизненно важный элемент, и его дефицит является стрессом для микроорганизмов. Поэтому изучение фосфорного голодания имеет фундаментальное значение для понимания адаптации микроводорослей. Кроме того, данное направление расширяет практические возможности по оптимизации культивирования микроводорослей. В качестве модельного объекта используется суспензионная периодическая культура зелёной одноклеточной микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. *C. reinhardtii* является модельным организмом в многочисленных биологических исследованиях, в том числе, стрессовых ответов, включая минеральное голодание. *C. reinhardtii* является миксотрофом способным как расти фотоавтотрофно так и утилизировать ацетат в качестве источника энергии и углерода. Таким образом, хламидомонада является удобным объектом для изучения стресса при разных трофических условиях.

Нами было установлено, что авто и миксотрофные культуры реагируют по-разному на снижение исходной концентрации в среде. Снижение концентрации фосфора в 2-4 раза не оказывала существенного действия на рост плотности культур им финальной плотности. При сокращении исходной концентрации фосфора в 4 раза происходило замедление сороти рота плотности сухой биомассы, но конечная плотность оставалась неизменной. Сокращение исходной концентрации фосфора в 8 раз и до нуля приводило к снижению скорости роста так и конечной плотности. В первом случае клеточная плотность снижалась на 40%, а во втором в пять раз. При этом конечная сухая биомасса снижалась всего примерно на 40%. Вероятно, это говорит о накоплении запасных соединений при подавлении пролиферации при дефиците фосфора. Влияние дефицита фосфора на автотрофные культуры оказалось менее выражено. Сокращение фосфора в 8 раз лишь немного замедляло рост культур. Лишь при сокращении фосфора до нуля падала скорость роста и финальная клеточная плотность.

Таким образом, трофический режим оказывал существенное воздействие на реакцию *Chlamydomonas reinhardtii* на сокращение доступного фосфора.

РНФ № 22-24-01152

Распространенность кластеров стероидного катаболизма среди прокариот

Брагин Е.Ю., Донова М.В.

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

Ключевые слова: биоинформатика, стероиды, стероидный катаболизм, программирование, perl, BLAST.

Поиск бактериальных штаммов, обладающих способностью к полной или частичной деградации стероидов, является актуальной задачей современной микробиологии и биотехнологии. К настоящему времени известно, что гены путей катаболизма стероидов организованы в несколько кластеров, таких как кластеры генов деградации стеринов, таких, как холестерин и ситостерин (van der Geize et al., 2011), желчных кислот, в частности холевой кислоты (Mohn et al., 2012), а также известен так называемый C-19 кластер (Fernández-Cabezón et al., 2017), который, по видимому, принимает участие в катаболизме диосгенина (Wang et al., 2024). Данная работа посвящена поиску бактерий обладающих стероидным катаболизмом и оценке распространенности различных кластеров генов стероидного катаболизма.

Проведен *in silico* поиск трех кластеров стероидного катаболизма у 15457 бактериальных штаммов, геномы которых представлены в базе данных NCBI. В качестве референсных использовали 42 последовательности ферментов, являющихся продуктами генов C-19 кластера *Mycolicibacterium smegmatis* MC2 155, 46 ферментов кластера катаболизма желчных кислот *Rhodococcus jostii* RHA1 и 67 ферментов кластера катаболизма стеринов *R. jostii* RHA1. Поиск генов, относящихся к кластерам стероидного катаболизма осуществлялся с помощью программы BLAST+ 2.9.0 (Crooks et al., 2004). Поскольку для осуществления поиска 155 генов в 15457 геномах потребовалось провести 23,9 миллиона выравниваний, для автоматизации работы BLAST+, а также для автоматической обработки данных была написана программа на языке Perl. Оценка наличия генных кластеров производилась следующим образом: каждый геном выравнивался к продукту каждого гена каждого кластера в режиме tblastn. Далее для каждого гена начислялись баллы: если в геноме штамма было найдено не менее одного гена, чей продукт был схож с референсом не менее чем на 50%, то это соответствовало 1 баллу. Если таких генов не было, но присутствовало не менее 1 гена, чей продукт был схож с референсом на 35-50%, то начислялось 0,5 балла, а если найдены гены, схожие с референсом на 25-35% и не найдено генов, схожих с референсом более чем на 35% - 0,25 балла. После этого для каждого кластера генов считалось общее число баллов и среднее (относительное) количество баллов, которое вычислялось делением общего количества баллов кластера на количество генов этого кластера. Если две и более референсных последовательностей выравнивались на один участок генома, то баллы начислялись только за выравнивание с наибольшим процентом идентичных аминокислот.

Всего было выявлено 1316 штаммов, относящихся к 95 родам, у которых хотя бы у одного из кластеров относительное количество баллов превышало 0,3. 77 обнаруженных родов относилось к типу *Actinomycetota*, а оставшиеся 18 — *Pseudomonadota*. Среди представителей *Actinomycetota* 73 родов, у которых были обнаружены кластеры стероидного катаболизма, найденные штаммы относятся к классу *Actinomycetes*. Оставшиеся 4 рода относятся к 3 классам — *Acidimicrobia*, *Thermoleophilia* и *Nitriliruptoria*. Среди *Pseudomonadota* кластеры генов катаболизма стероидов встречаются у представителей классов *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Следует отметить, что наличие в каком-либо таксоне, штаммов, обладающих стероидным катаболизмом, не означает, что все представители данного таксона также обладают кластерами генов катаболизма стероидов. В частности, из 95 родов, у которых были найдены представители, обладающие стероидным катаболизмом, у 45 родов также присутствовали штаммы, у которых исследуемых кластеров не обнаружено.

Среди 1316 штаммов, у которых были обнаружены кластеры стероидного катаболизма, кластеры катаболизма стеринов были обнаружены у 1311, кластеры катаболизма желчных кислот — у 340, а диосгенина — у 223 штаммов. При этом не было выявлено ни одного штамма, у которого был бы кластер катаболизма диосгенина, но не было бы кластера катаболизма стеринов. Схожая

ситуация и с кластером катаболизма желчных кислот — всего 5 штаммов обладают данным кластером, но лишены кластеров катаболизма стеринов. При этом практически все штаммы, у которых присутствовали кластеры катаболизма диосгенина или желчных кислот, относятся к классу *Actinomycetes*. Единственное исключение — бетапротеобактерия *Paraburkholderia oxyphila*, у которой среднее количество баллов кластера катаболизма желчных кислот составляет 0,304, что лишь ненамного превышает порог отсечения в 0,3 балла и не может быть однозначным доказательством наличия данного кластера.

Таким образом, при исследовании геномов 15457 штаммов было показано наличие кластеров стероидного катаболизма у 8,51% штаммов, тогда как у 91,49% исследуемых штаммов кластеры стероидного катаболизма обнаружены не были. У 99,8% штаммов, у которых данные кластеры все же были обнаружены, было показано наличие кластера катаболизма стеринов. У 25,8% обнаружен кластер катаболизма желчных кислот, на который приходится не менее чем по 0,3 балла на ген, а у 16,9% штаммов не менее чем по 0,3 балла приходится на гены кластера катаболизма диосгенина.

Результаты важны для поиска новых перспективных биокатализаторов процессов структурной модификации стероидных соединений.

Список литературы:

1. van der Geize R, Grommen AW, Hessels GI, Jacobs AA, Dijkhuizen L. The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen Rhodococcus equi is important for pathogenesis and a target for vaccine development. PLoS Pathog. 2011, 7(8):e1002181. doi: 10.1371/journal.ppat.1002181..
2. Mohn WW, Wilbrink MH, Casabon I, Stewart GR, Liu J, van der Geize R, Eltis LD. Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp. J Bacteriol. 2012. 194(24):6712-9. doi: 10.1128/JB.01169-12.
3. Fernández-Cabezón, L., García-Fernández, E., Galán, B., & García, J. L. Molecular characterization of a new gene cluster for steroid degradation in *Mycobacterium smegmatis*. Environmental microbiology. 2017. *19*(7):2546-2563. doi:10.1111/1462-2920.13704
4. Wang, Z., Qiu, H., Chen, Y., Chen, X., Fu, C., Yu, L. Microbial metabolism of diosgenin by a novel isolated *Mycolicibacterium* sp. HK-90: a promising biosynthetic platform to produce 19-carbon and 21-carbon steroids. Microbial Biotechnology. 2024. *17*(2), e14415. doi:10.1111/1751-7915.14415
5. Crooks, G.E.; Hon, G.; Chandonia, J.-M.; Brenner, S.E. WebLogo: A sequence logo generator. Genome Res. 2004. *14:*1188–1190. doi:10.1101/gr.849004.

Изменение активности ацетамидазного промотора в клетках *Mycolicibacterium smegmatis* в результате модификации оператора

Бяков А.А.[1], Торохов Т.Ю.[2], Карпов М.В.[1], Донова М.В.[1]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Биотехнологический факультет)
artyom.byakov.wrk@yandex.ru

Ключевые слова: *Mycolicibacterium smegmatis*, ацетамидазный промотор, мутагенез, GFP.

Ацетамидазный промотор *Mycolicibacterium smegmatis* является самым сильным на сегодняшний день драйвером, применяемым для продукции рекомбинантных белков в клетках актинобактерий, в особенности миколицибактерий. Он способен обеспечить не только высокий уровень, но и правильную стехиометрию экспрессии генов, организованных в полицистронные опероны.

Ацетамидаза (продукт гена *amiE*) – один из ферментов, определяющих способность *M. smegmatis* использовать ацетамид в качестве единственного источника углерода. Ген *amiE* контролируется индуцибельным промотором P2 и находится в одном регулоне с расположенными выше по течению генами *amiS* и *amiD*. Контроль индукции P2 ацетамидом осуществляется позитивным и негативным белковыми регуляторами, которые кодируются выше по течению генами *amiC* и *amiA* соответственно. Геномная область, кодирующая локус *amiCADS*, образует основу векторов экспрессии генов под контролем регулона ацетамидазы, где ген *amiE* заменяется целевым геном. Причем сокращенный *amiCA*-вариант характеризуется повышенным контролем с сохранением уровня экспрессионной активности [2].

Регуляторная область промотора P2 содержит оператор негативной регуляции, с которым связывается репрессор AmiA в отсутствии ацетамида. Операторный ДНК-участок представляет собой два прямых ДНК-повтора (ПП1 и ПП2), пересекающихся с точкой начала транскрипции и участком, кодирующим сайт связывания с рибосомой (RBS). Показано, что направленные мутации, связанные с утратой повторяющихся последовательностей, приводят к прекращению связывания AmiA с оператором *in vitro* [3]. Актуальной задачей является уточнение и верификация механизмов регуляции экспрессии ацетамидазного регулона.

Цель исследования – репортерный анализ *in vivo* изменения активности промотора P2 ацетамидазного регулона в клетках актинобактерий *M. smegmatis* в результате мутагенеза последовательности оператора.

ДНК-последовательность, кодирующая гены *amiCA* и регуляторные элементы промотора P2 (регионы -35 и -10, ПП1, ПП2, RBS), была амплифицирована с использованием ДНК-матрицы вектора pMyCA и лигирована с беспромоторным остовом плазмиды pMV261 с образованием плазмиды pMVCAP. ПЦР-амплификацией с использованием мутирующих олигонуклеотидных праймеров была получена плазмида pMVCAPK с введенными нуклеотидными заменами в области оператора, приведшими к потере ПП1 и ПП2. Ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок turboGFP, был клонирован в сконструированных плазмидах. Полученные конструкции были перенесены электропорацией в клетки *M. smegmatis* mc^2155 для изучения промоторной активности *in vivo*.

Рекомбинантные *M. smegmatis* выращивали 24 часа, осаждали и ресуспендировали в буфере PBS (pH – 7,3) до оптической плотности OD_{600}=1. В качестве отрицательного контроля выступали клетки *M. smegmatis* pMV261 без добавления индуктора. Флуоресценцию детектировали с помощью планшетного флуориметра.

В отличие от *M. smegmatis* pMV261 и *M. smegmatis* pMVCAP-tGFP штамм *M. smegmatis* pMVCAPK-tGFP осуществлял УФ-зависимую флуоресценцию как при наличии, так и в отсутствие индуктора. При индукции ацетамидом удельная активность варианта с мутацией была в 3 раза

выше, чем у штамма с оригинальной последовательностью оператора. Присутствие индуктора увеличивало светимость бактерий с pMVCAPK-tGFP в среднем в 50-100 раз.

Таким образом, несмотря на удаление повторов в области оператора, промотор P2 демонстрировал высокие уровни экспрессии в клетках миколицибактерий только при наличии в культуральной среде ацетамида, но имел повышенную активность по сравнению с интактной операторной последовательностью. Результаты дополняют известные данные о механизмах индукции ацетамидазного регулона, а также открывают возможности конструирования новых векторов для эффективной экспрессии генов в клетках миколицибактерий.

Работа выполнена в рамках Государственного задания (тема № 122040500054-3).

Список литературы:

[1] Poulsen C., Holton S., Geerlof A., Wilmanns M., Song Y.H. Stoichiometric protein complex formation and over-expression using the prokaryotic native operon structure. FEBS Lett. 2010; 584(4):669-674.

[2] Magaña Vergara C., Kallenberg C.J.L., Rogasch M., Hübner C.G., Song Y.H. A versatile vector for mycobacterial protein production with a functional minimized acetamidase regulon. Protein Sci. 2017; 26(11):2302-2311.

[3] Sundararaman B., Palaniyandi K., Venkatesan A., Narayanan S. Expression, purification and functional characterization of AmiA of acetamidase operon of *Mycobacterium smegmatis*. Microbiol Res. 2014; 169(11):873-880.

Пентозофосфатный путь - основной регулятор развития SICD в дрожжах *S.cerevisiae*

Валиахметов А.Я.

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

Ключевые слова: дрожжи, SICD, гликолиз, пентозофосфатный путь, ROS.

Инкубация клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в воде, содержащей 100 мМ глюкозы, приводит к гибели части популяции, что получило название SICD (sugar-induced cell death). Ранее нами было показано, что развитие SICD критически зависит от мембранного потенциала, наблюдается преимущественно в клетках S-фазы клеточного цикла и вызывается избытком активных форм кислорода (ROS) [1,2]. Кроме того, уровень SICD определяется перераспределением потоков глюкозы между гликолитическим и пентозофосфатным путями (ПФП) [3]. Нарушение гликолиза сопровождается усилением поступления глюкозы в ПФП. В частности, при ингибировании глицероальдегид дегидрогеназы (Tdh3p) йодацетамидом (IAA) или делеции гена *TDH3* уровни ROS и SICD значительно снижаются. Однако оставалось неясным, какая ветвь ПФП — окислительная (генерирующая NADPH) или неокислительная (синтезирующая рибозо-5-фосфат, Р-5-Ф) — вовлечена в регуляцию ROS/SICD.

Делеция гена *ZWF1*, кодирующего глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу — первый фермент на входе в окислительную ветвь ПФП, — не изменяла динамику ROS/SICD по сравнению с родительским штаммом BY4742. Это указывает на отсутствие участия NADPH, продуцируемого в окислительной ветви ПФП, в нейтрализации ROS (через восстановление глутатиона глутатионредуктазой Glr1p). Тем не менее Glr1p может использовать альтернативные восстановительные эквиваленты, генерируемые другими ферментами. Если бы Glr1p был критически важен, его отсутствие должно было бы приводить к увеличению ROS/SICD. Однако в штамме Δ*GLR1* динамика ROS/SICD также не отличалась от BY4742.

Поскольку эти наблюдения получены на штаммах с функционирующим гликолизом, была проверена реакция систем с блокированным гликолизом. При обработке клеток IAA как Δ*GLR1*, так и Δ*ZWF1*, а также родительский штамм BY4742 демонстрировали дозозависимое снижение уровней ROS/SICD (рис. 1, 2).

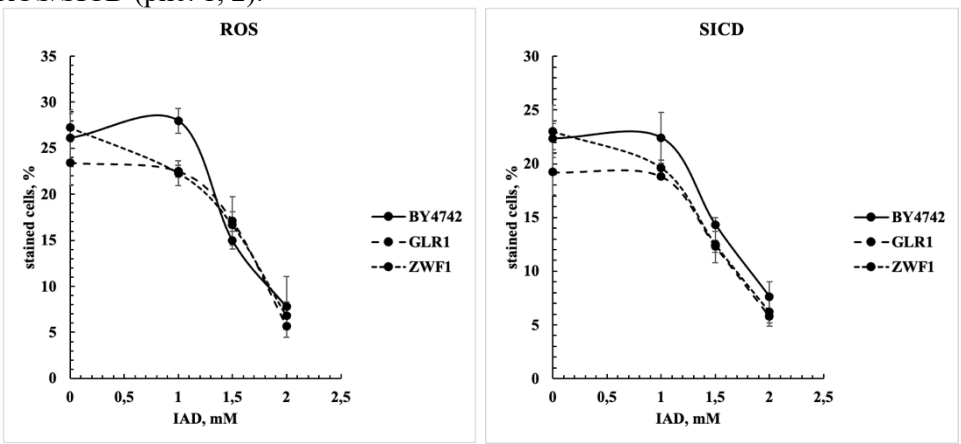
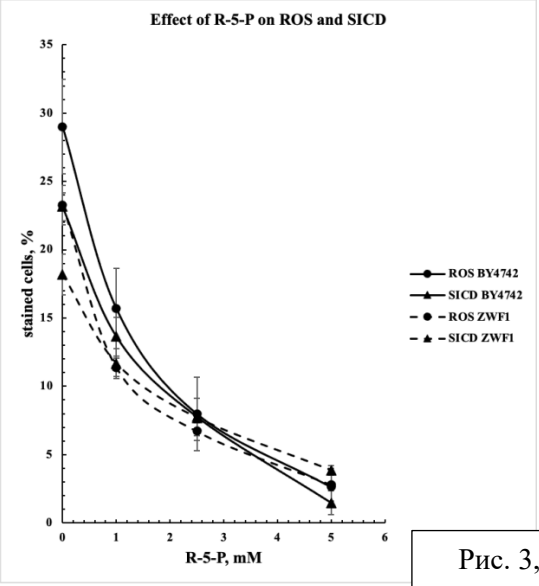


Рис. 1, 2

Это указывает, что окислительная ветвь ПФП не участвует в подавлении ROS/SICD. Если бы NADPH, вырабатываемый окислительной ветвью, участвовал в восстановлении глутатиона, то в штаммах Δ*GLR1* и Δ*ZWF1* снижение ROS/SICD не наблюдалось бы. Следовательно, глицеральдегид-3-фосфат (ГАФ), накапливающийся при блокировании Tdh3p, поступает в неокислительную ветвь ПФП через реакции транскетолазы и трансальдолазы, а не в ходе глюконеогенеза (образующего глюкозо-6-фосфат — субстрат для Zwf1p).

В неокислительной ветви ПФП ГАФ перерабатывается в рибозо-5-фосфат (Р-5-Ф) — предшественник для синтеза дезоксинуклеотидов (dNTP). Поскольку SICD наблюдается преимущественно в клетках S-фазы, когда потребность в Р-5-Ф максимальна, дефицит этого

метаболита при нарушении ПФП может вызывать дефицит dNTP, остановку репликативной вилки и гибель клетки. Добавление внеклеточного Р-5-Ф (но не рибозы) полностью предотвращало накопление ROS и развитие SICD (рис. 3,4). Таким образом, ключевую роль в регуляции SICD играет именно неокислительная ветвь ПФП.



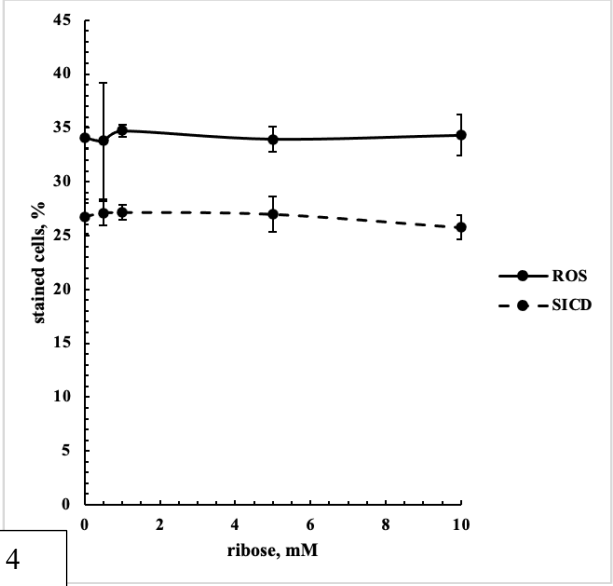


Рис. 3, 4

Предлагаемая модель включает следующие этапы. Глюкоза служит сигналом достаточности энергетического субстрата, активируя катаболизм. Однако при отсутствии других элементов, необходимых для роста и деления (азота, фосфора, серы и др.), ПФП не активируется, несмотря на наличие глюкозы и функционирующий гликолиз. В результате клетки S-фазы испытывают дефицит Р-5-Ф, что приводит к остановке репликации, «митотической катастрофе» и гибели. Вероятно, именно в этих условиях формируется источник ROS, ответственный за развитие SICD. Эту гипотезу подтверждает существенное подавление ROS/SICD при частичном восстановлении функциональности ПФП: (1) в штамме Δ*TDH3*, (2) при ингибировании Tdh3p IAA, (3) при добавлении Р-5-Ф.

Отдельный вопрос представляет путь проникновения Р-5-Ф в клетку. Специфические переносчики фосфосахаров у дрожжей не описаны, а пассивная диффузия через плазматическую мембрану невозможна из-за высокого заряда Р-5-Ф. Наиболее вероятно его поступление посредством эндоцитоза. Альтернативно, в S-фазе, отличающейся по метаболическому статусу от G1- и G2-фаз, одна из мембранных транспортных систем может проявлять «moonlighting»-функцию, обеспечивая перенос Р-5-Ф внутрь клетки.

Список литературы:

1. Valiakhmetov et al., 2019, FEMS Yeast Res, 19
2. Bidiuk et al., 2021, Arch Microbiol, 204, 35
3. Valiakhmetov, 2025, FEMS Microbiology Letters 372.

Подавление гемолитической активности цитотоксина К2 и гемолизина II *Bacillus cereus* нейтрализующими моноклональными антителами, защита *in vivo*

Ветрова О.С.[1], Руденко Н.В.[1], Каратовская А.П.[1], Замятина А.В.[1], Нагель А.С.[2], Андреева-Ковалевская Ж.И.[2], Сиунов А.В. [2], Бровко Ф.А.[1], Солонин А.С.[2]

[1] Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Филиал ГНЦ ИБХ РАН)
[2] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)

Нейтрализующие антитела защищают клетку от патогена или инфекционной частицы, нейтрализуя любой биологический эффект, который он оказывает. Нейтрализация антителами способна защитить клетку от действия патогенов и их вирулентных факторов. Широко распространенные в окружающей среде условно-патогенные грамположительные спорообразующие бактерии *Bacillus cereus* секретируют гемолизин II (HlyII) и цитотоксин К2 (CytK2), относящиеся к группе β-пороформирующих токсинов, способные разрушать мембраны клеток хозяина, приводя их к лизису.

Среди панели моноклональных антител против большого С-концевого фрагмента гемолизина II (HlyII) было выявлено антитело LCTD-83 способное штамм-специфически подавлять гемолитическую активность HlyII [1]. Моноклональное антитело HP-5, полученное против участка Lys171-Gly250 (нумерация согласно первичной последовательности полноразмерного HlyII), одновременно узнавало альфа-гемолизин *Staphylococcus aureus*, HlyII и CytK2 *B. cereus*, подавляло гемолитическую активность только CytK2 B. cereus и HlyIIдельтаCTD [2].

Известно, что при отсутствии биологических мембран в растворе полноразмерный HlyII преимущественно находится в мономерной форме. При взаимодействии с мембраной клетки-мишени мономеры HlyII образуют стабильные олигомерные формы. Методом иммуноблотинга показано, что предварительная обработка полноразмерного HlyII B-771 антителом LCTD-83, а также предварительная обработка CytK2 антителом HP-5 не препятствовала олигомеризации токсина при взаимодействии с мембраной эритроцита.

Мембрансвязанные формы гемолизина II и цитотоксина К2, полученные после делипидизации фрагментов мембран клеток, лизированных HlyII и CytK2, выявляли иммунопреципитацией с соответствующими антителами с последующим иммуноблотингом. Показано, что нейтрализующие антитела LCTD-83 взаимодействовали с мембранными фрагментами, содержащими HlyII B-771, антитела HP-5 взаимодействовали с мембранными фрагментами, содержащими CytK2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что моноклональные антитела LCTD-83 и HP-5 имеют схожий механизм действия: блокируют пору, образовавшуюся на мембране клетки-мишени, препятствуя выходу ее содержимого, предотвращая лизис клетки.

Эксперименты по ингибированию токсической активности HlyII B-771 антителом LCTD-83 и CytK2 антителом HP-5 *in vivo* проводили на белых мышах линии BALB/c. Животным внутривенно через хвостовую вену вводили дозу токсина, равную LD_{50}, подобранную заранее, и соответствующее количество токсина, предварительно инкубированного с различными количествами исследуемого антитела. LD_{50} для CytK2 и HlyII B-771 составили 3,3 и 35 гемолитических единиц (ГЕ) соответственно.

Минимальное молярное соотношение токсин/антитело в обоих случаях, как при тестировании HlyII B-771, так и CytK2, при котором все мыши, которым была сделана инъекция токсина, инкубированного с соответствующим антителом, оставались живы через 24 ч наблюдения, составило 1/0,2. В контрольной группе оставались живы только 50% животных, которым была сделана инъекция токсина в дозе LD_{50}. При этом отклонение в каждой отдельной экспериментальной группе (n=6) составляло не более 25%. Таким образом защитное действие антител LCTD-83 в отношении HlyII B-771 и HP-5 в отношении CytK2 *B. cereus* подтверждено *in vivo*.

10.24412/cl-37448-2025-1-052-053

Моноклональные антитела LCTD-83 и HP-5 продемонстрировали потенциальные возможности для дальнейшей разработки препаратов, способных подавлять действие основных патогенных факторов *B. cereus.* Возможно, что комбинация антител против более чем одного фактора вирулентности с широким спектром нейтрализующей способности может оказаться эффективной в качестве профилактической или терапевтической меры противодействия инфекции.

Работа поддержана РНФ (проект № 22-74-10026-П).

Список литературы:

1. Nagel AS, Rudenko NV, Luchkina PN, Karatovskaya AP, Zamyatina AV, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Siunov AV, Brovko FA, Solonin AS. 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.

2. Nagel AS, Vetrova OS, Rudenko NV, Karatovskaya AP, Zamyatina AV, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Salyamov VI, Egorova NA, Siunov AV, Ivanova TD, Boziev KM, Brovko FA, Solonin AS. A High-Homology Region Provides the Possibility of Detecting β-Barrel Pore-Forming Toxins from Various Bacterial Species. Int J Mol Sci. 2024 May 14;25(10):5327. doi: 10.3390/ijms25105327. PMID: 38791367; PMCID: PMC11120785.

Разработка тест-системы в формате сэндвич-иммуноферментного анализа для выявления гемолизина II, секретируемого *Bacillus cereus*

Ветрова О.С.[1], Руденко Н.В.[1], Каратовская А.П.[1], Замятина А.В.[1], Нагель А.С.[2], Андреева-Ковалевская Ж.И.[2], Сиунов А.В.[2], Бровко Ф.А.[1], Солонин А.С.[2]

[1] Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Филиал ГНЦ ИБХ РАН)

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

Распространение и способность выживать в разнообразных условиях среды, в том числе и экстремальных делают условно-патогенную *Bacillus cereus* возможным источником заражения. Одним из значимых патогенных факторов этой бактерии является β-пороформирующий гемолизин II (HlyII) [1].

Для разработки тест-системы детекции HlyII использовали панели моноклональных антител высокой специфичности, не демонстрирующие иммуноперекрестной активности, полученные к отдельным участкам гемолизина II *B. cereus.* Были проверены все их возможные сочетания, в которых каждое антитело было использовано как в качестве антитела «захвата» (нижнего), так и в качестве антитела «детекции» (верхнего). Биотинилированные формы использовали в качестве антител «детекции», что позволило не только выявлять образовавшиеся иммунные комплексы, но и усиливать сигнал, используя конъюгат стрептавидина с пероксидазой для визуализации реакции. Возможные кандидаты для разрабатываемой тест-системы оценивали по значению соотношения «сигнал/фон» (отношение оптической плотности в лунках с добавленным антигеном к оптической плотности в лунках без добавления антигена). При этом все выявленные детектирующие пары с меньшим соотношением «сигнал/фон» содержали только антитела против С-терминального домена, возможно этот факт коррелирует с уникальными функциями этого домена, состоящими в способности независимо и ориентированно связываться с мембранами клетки-мишени и олигомеризоваться в их присутствии. Среди всех проверенных сочетаний максимальное значение соотношения, равного 16,9±0,1 демонстрировала пара моноклональных антител HlyIIC-11+ HlyIIC-20био [2]. Тест-систему разрабатывали для HlyII, секретируемого штаммом *B. cereus* ATCC14579.

При разработке тест-системы был определен рабочий калибровочный диапазон, построены градуированные кривые для определения концентрации токсина в фосфатно-солевом буферном растворе, сыворотке крови и культуральной жидкости. Для оценки прецизионности и воспроизводимости проводили не менее трех аналитических экспериментов, внутри каждого по три параллельных измерения. Внутрианализная точность не превышала 8%, межанализная точность не превышала 10%. Общая ошибка метода не превышала 30%.

Показано, что разработанная тест-система эффективно выявляла HlyII, не только секретируемый штаммом *B. cereus* ATCC14579, но и B-771, ATCC4342. При этом диапазон определения составил: 6,25 - 200 нг/мл.

Способность разработанной тест-системы выявлять мутантные формы HlyII, и токсин, секретируемый различными штаммами *B. cereus,* расширяет возможность ее применения. Диагностическое значение оценки содержания HlyII в биологических жидкостях или в культуральной жидкости клинических изолятов значимо, так как токсин существенно влияет на общую картину заболевания, разрушая клетки иммунной системы и эритроциты.

Работа поддержана РНФ (проект № 22-74-10026-П).

Список литературы:

1. Baida G., Budarina Z.I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. Complete nucleotide sequence andmolecular characterization of hemolysin II gene from Bacillus cereus. FEMS Microbiol.Lett. 1999. V. 180. No. 1. P. 7–14. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08771.x

2. Rudenko N, Nagel A, Zamyatina A, Karatovskaya A, Salyamov V, Andreeva-Kovalevskaya Z, Siunov A, Kolesnikov A, Shepelyakovskaya A, Boziev K, Melnik B, Brovko F, Solonin A. A Monoclonal Antibody against the C-Terminal Domain of Bacillus cereus Hemolysin II Inhibits HlyII Cytolytic Activity. Toxins (Basel). 2020 Dec 19;12(12):806. doi: 10.3390/toxins12120806. PMID: 33352744; PMCID: PMC7767301.

Экспорт белков у дрожжей при изменении условий культивирования

В. В. Дмитриев, Т. Г. Русакова, А.Н. Звонарев

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

Ключевые слова: дрожжи, клеточная стенка каналы, белки, экспорт.

Целью данной работы была разработка метода отделения и фракционирования специфических структур клеточной оболочки дрожжей – каналов и экзоцеллюлярных компонентов каналов, участвующих в использовании углеводородов (н-алканов - гексадекана) в качестве источника углерода. Без решения этой задачи весьма затруднительно выявить специфические белки и углеводные компоненты, входящие в состав каналов, а также оценить возможность присутствия в них других соединений. Сложность выделения вещества каналов из оболочки дрожжей объясняется тем, что эти структуры прочно связаны с основными компонентами клеточной стенки, так как являются результатом биохимической модификации определенных участков клеточной оболочки при адаптации клеток к утилизации углеводородных субстратов (1, 2, 3). В клеточной оболочке образуется сложный полиферментный комплекс, способный окислять углеводороды до состояния их использования клеткой в качестве источника углерода. Было обнаружено, что при замене углеводородного субстрата на углеводный в условиях дефицита ростовых факторов происходит экспорт вещества каналов и их экзоцеллюлярных компонентов в окружающую среду, а дрожжевая оболочка восстанавливает свою исходную («глюкозную») структуру. Это свойство было использовано для реализации цели данной работы.

Результаты

Дрожжевые клетки при замене углеродного субстрата для роста с глюкозы на углеводороды (гексадекан) претерпевают существенные ультраструктурные перестройки.

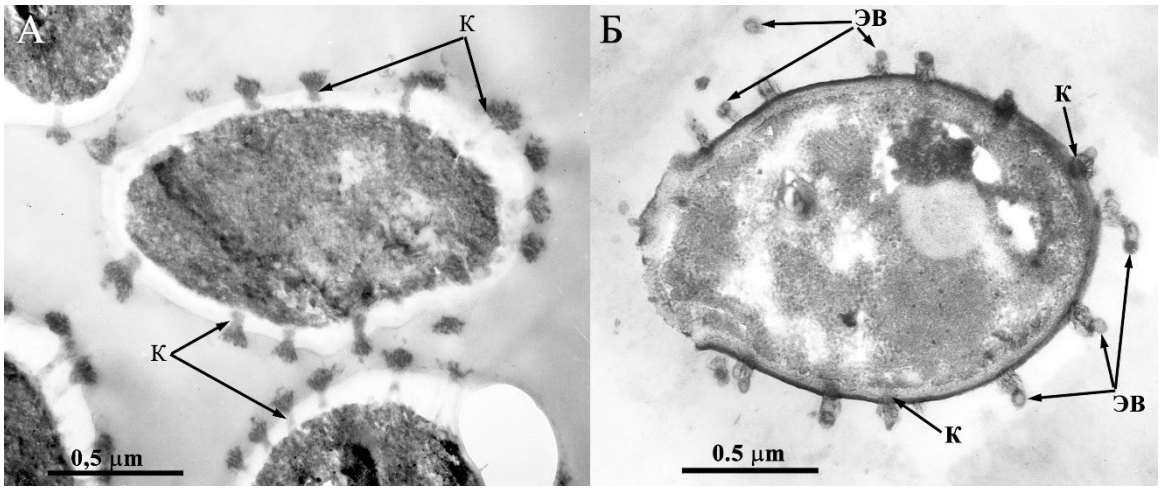


Рис 1 А. Дрожжи *C. maltosa.* Ультратонкие срезы клеток при росте на гексадекане.

Цитохимическая реакция на окислительные ферменты. Условные обозначения: К – каналы.

Б. Ультратонкие срезы *C. maltosa* Цитохимическая реакция с диаминобензидином на окислительные ферменты. Редукция клеточной стенки при переносе в неростовую среду с глюкозой путём выброса (экспорта) вещества каналов в окружающую среду. Условные обозначения: К - канал, ЭВ – экспортные везикулы

Было обнаружено, что если дрожжевые клетки с каналами, выращенные на углеводородах, переносить в среду, состоящую из 1% глюкозы на 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,8, то клетки не размножались из-за отсутствия в среде необходимых ростовых факторов. Электронно-микроскопический анализ этих клеток показал, что после 3-х часовой инкубации в этой среде наблюдалось почти полное исчезновение каналов, сопровождающееся выбросом (экспортом) их

содержимого в культуральную среду (Рис 1). На поверхности клеток и в среде культивирования отмечалось появление значительного количества везикулярных образований (экспортных везикул), дающих цитохимическую реакцию с диаминобензидином на окислительные ферменты.

Полученные данные свидетельствуют о том, что комплекс окислительных ферментов, локализованный в каналах экспортируется в культуральную среду в связи с отсутствием углеводородов в качестве источника углерода и других необходимых для роста веществ при перехода клеток в другое физиологическое состояние (неростовая среда). При этом, при переносе клеток в ростовую полноценную ростовую среду в которой в качестве источника углерода является глюкоза, образуют почки без каналов в клеточной стенке. Суммированные результаты данной работы показаны на Рис 2.

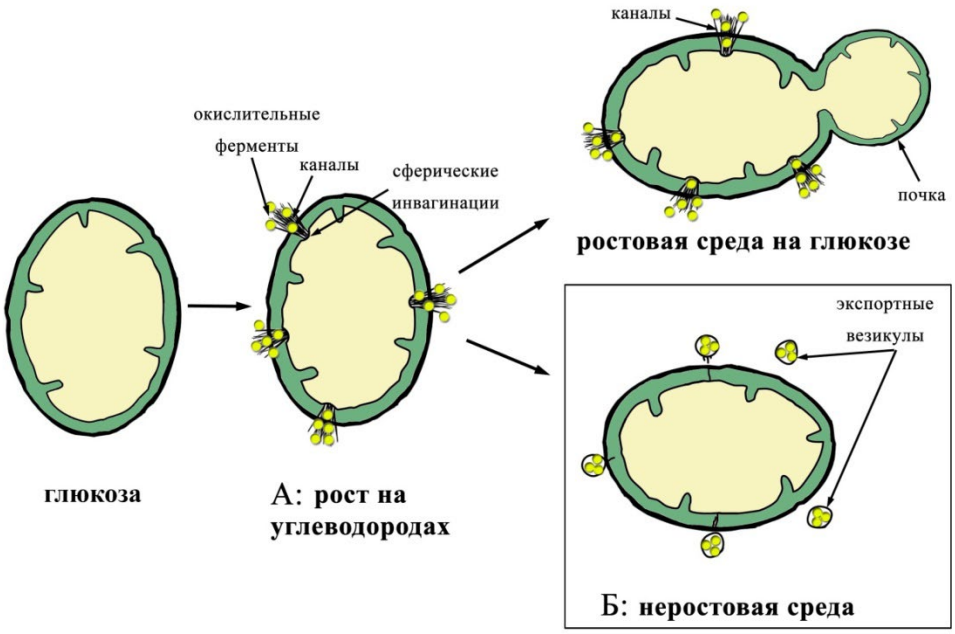


Рис 2. Суммированная схема результатов

Сравнительный электрофорез (Рис 3) белковых профилей культуральной жидкости у клеток при росте на углеводородах и в условиях неростовой среды показали их существенное различие. Эти данные являются важной предпосылкой для дальнейшего изучения белкового состава каналов клеточной оболочки дрожжей.

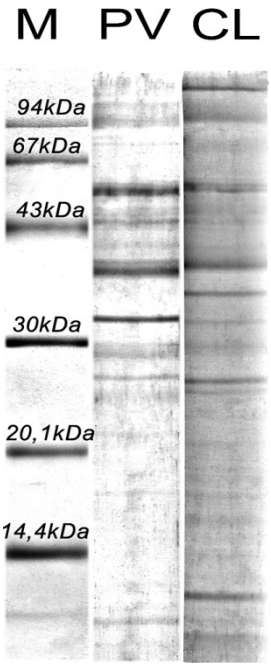


Рис 3. Сравнительная электрофореграмма. M – метчики, PV – белки в культуральной неростовой среде, CL - белки в культуральной среде в условия роста на углеводородах.

Заключение и обсуждение

Описанный нами эффект экспорта белков дрожжевыми организмами помимо фундаментального нового явления у дрожжевых организмов может иметь практическое значение в биотехнологии. Производство ферментных препаратов представляет собой сложный процесс, включающий дорогостоящий этап очистки. В последнее время все большее внимание уделяется возможности закрепления белков на поверхности клеток микроорганизмов. Иммобилизация ферментов *in vivo* имеет ряд преимуществ по сравнению с иммобилизацией на сорбентах. Фермент, продуцируемый клеткой, оказывается связанным с ней сразу после транспортировки его наружу, что сводит трудоемкий процесс очистки белка к простому отделению клеток фильтрацией. Получение клеток-биокатализаторов с экспонированными на их поверхности ферментами может оказаться перспективным в новых технологических решениях. Экзоцеллюлярные компоненты микробных клеток могут использоваться в качестве структурообразующей матрицы, поскольку они характеризуются хорошей

стабильностью и биосовместимостью и имеют значительный потенциал для различных биомедицинских и биотехнологических решений (4).

Иммобилизация микроорганизмов или ферментов в матриксе стабилизирует их каталитическую активность, обеспечивая возможность многократного или непрерывного использования. Сложные подходы к оптимизации секреции нацелены на направленную инженерию штаммов-реципиентов с целью модификации ключевых этапов секреции белка на генетическом уровне (5). Прогресс в области оптимизации систем экспрессии за три последних десятилетия, прошедших с момента создания технологической платформы экспрессии генов в дрожжах, в основном был направлен на преодоление одного из известных недостатков клетки-хозяина - ее ограниченной способности секретировать из клетки в окружающую среду рекомбинантные белки. Считается, что эффективность секреции белков дрожжами в сотни раз ниже теоретического максимума. Для повышения эффективности секреции принципиально можно варьировать следующие параметры: условия культивирования, векторная система, промотор, использование кодонов, тип сигнального пептида, этапы процессинга и фолдинга. В данной работе мы сделали акцент на варьирование условий культивирования.

Список литературы:

1 Dmitriev V. V. Crowley D., Rogachevsky V. V., Negri C.M., Rusakova T. G., Kolesnikova S. A., Akhmetov L. I Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media. FEMS Microb Lett 2011;315:2:134-140.

2 Dmitriev V. V. Crowley D. E, Zvonarev A. N., Rusakova T. G., Negri M. C, Kolesnikova S. A. Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions. Yeast 2016;33:2:55-62.

3 Zvonarev A., Farofonova V., Kulakovskaya E., Kulakovskaya T., Machulin A., Sokolov S., Dmitriev V. Changes in cell wall structure and protein set in *Candida maltosa* grown on hexadecane. Folia Microbiologia 2021;66(2):247-253. doi: 10.1007/s12223-020-00840-2.

4 Bouaziz A., Houfani A.A., Baoune H. Enzymology of Microbial Biofilms, in: Maddela, N.R., Abiodun, A.S., Prasad, R. (Eds.), Ecological Interplays in Microbial Enzymology, Environmental and Microbial Biotechnology. Springer Nature, Singapore, 2022, pp. 117–140. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0155-3_7

5 Юзбашева Е. Ю**.,** Юзбашев Т. В., Константинова Т. К., Лаптев И. А., Перковская Н. И., Синеокий С. П. Способность N- и С-доменов гомолога белка клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* Flolp экспонировать липазу Lip2 на поверхности клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Биотехнология (Москва), 2011;1:23-29.

Изменение уровней глутатиона у бактерий *Escherichia coli* в условиях азотного голодания

Жуланова Н.С., Тюленев А.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН

Ключевые слова: *Escherichia coli*, глутатион, азотное голодание.

Трипептид глутатион (GSH) является одним из основных низкомолекулярных тиолов у грамотрицательных бактерий. Он выполняет функции основного редокс-буфера в клетке и периплазме, играя важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза, детоксикации активных форм кислорода и защите от стрессов (Smirnova, Oktyabrsky, 2005) В аэробных культурах *Escherichia coli* поддерживается непрерывная циркуляция GSH из цитоплазмы в окружающую среду. Как было показано ранее, уровни глутатиона в цитоплазме и периплазматическом пространстве *E. coli* могут динамически меняться в зависимости от физиологического состояния, доступности питательных веществ и воздействия различных стрессов (Smirnova et al., 2012).

Целью работы было изучение изменения уровней глутатиона в аэробных культурах *Escherichia coli* при голодании по азоту.

Объект исследования – штамм *E. coli* BW25113 (родительский тип) из коллекции Keio. Ночную культуру, выращенную на минимальной среде M9 с 0,15% глюкозы и 1 г/л NH_4Cl, переносили в свежую питательную среду M9 с глюкозой, содержащую 0,025 г/л NH_4Cl. Бактерий выращивали в колбах на 250 мл в термостатируемом орбитальном шейкере (37 °C, 150 об/мин). Уровни внутри- и экстраклеточного глутатиона определяли с помощью модифицированного метода Титца, основанного на взаимодействии глутатиона с глутатионредуктазой и реагентом Эллмана (DTNB) с образованием окрашенного продукта, поглощающего в области 412 нм (Tietze, 1969). Оптическую плотность (OD_{600}) и удельную скорость роста (μ) определяли традиционными способами.

После переноса культуры *E. coli* в питательную среду с лимитированным количеством азота клетки поддерживали рост на протяжении 120 минут, после чего удельная скорость роста начинала резко снижаться, что свидетельствовало об индукции голодания.

В растущей культуре базовый уровень экстраклеточного глутатиона (GSH_{out}) составлял 1,21±0,13 мкМ/OD_{600}. Через 15 минут после наступления голодания, было отмечено, что уровень GSH_{out} снижался в 1,2 раза, в дальнейшем поддерживался в этих значениях. Напротив, количество внутриклеточного глутатиона (GSH_{in}) после наступления голодания по азоту и остановки роста постепенно увеличивалось до 6,61±0,37 мкМ/OD_{600}, что в 1,9 раз превышало уровень в растущих культурах (3,45±0,27 мкМ/OD_{600}).

Через 90 минут после начала голодания в среду вносили избыток NH_4Cl, после чего рост культуры возобновлялся. Уже через 30 минут отмечалось повышение уровня GSH_{out} до 0,98±0,1 мкМ/OD_{600}, что сопоставимо со значениями в растущих культурах. В тоже время наблюдалось снижение концентрации GSH_{in} в 1,3 раза (до 5,07±0,34 мкМ/OD_{600}) в течение первых 30 минут после внесения источника азота.

Таким образом, при наступлении азотного голодания в аэробных культурах *E. coli* отмечаются значительные изменения уровней GSH как в клетке, так и в среде. Возобновление роста сопровождалось активацией экспорта глутатиона в среду. Эти данные могут свидетельствовать об участии GSH в поддержании редокс-гомеостаза у *E. coli* в ходе адаптации к азотному голоданию.

Список литературы:

1. Smirnova, G.V. Glutathione in bacteria / G.V. Smirnova, O.N. Oktyabrsky // Biochemistry (Moscow). – 2005. – V. 70. – P. 1199-211.
2. Smirnova, G.V. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells / G.V. Smirnova, N.G. Muzyka, O.N. Oktyabrsky // Microbiol. Res. – 2012. –V. 167. – P. 166-172.
3. Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues / F. Tietze // Anal. Biochem. – 1969. – V. 27. – P. 502-522.

Новая перевиваемая линия клеток селезёнки свиньи как модель для изучения репродукции вируса АЧС

Земскова М.Ю.[1,2], Пильгуй Л.С.[1], Власова Н.Н.[2], Калинин Д.С.[3], Шляпников М.Г.[1], Грановский И.Э.[1,3]

[1] ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБФМ РАН)
[2] ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
[3] ФИЦ Биотехнологии РАН
marinazem@pbcras.ru

Ключевые слова: вирус АЧС, культивируемые клетки, hTert теломераза, Т-антиген вируса SV40, вирусные фабрики.

На сегодняшний день известны многие клеточные линии, которые могли бы использоваться для культивирования вируса АЧС в лабораторных условиях. Макрофаги и моноциты являются основной мишенью для вируса АЧС при заражении свиней. Они долгое время использовались как единственный возможный источник для культивирования вируса *in vitro*, поскольку способны поддерживать высокий уровень репликации различных вирусных изолятов. К недостаткам подобных первичных, неиммортализованных линий следует отнести трудоемкость их получения, сложность стандартизации, культивирования и поддержания в лабораторных условиях. Известные к настоящему времени перевиваемые, иммортализованные линии клеток свиньи ZMAC-4 (макрофаги легких эмбриона свиньи), IPAM (макрофаги, выделенные из альвеол лёгких свиньи), WSL (клетки легких дикого кабана) IPKM (макрофаги почки свиньи) и A4C2 (полусуспензионная гибридная линия клеток эпителия почки и лимфоцитоподобных клеток свиньи) имеют ряд недостатков, связанных с ограничением размножения различных вирусных изолятов и, в основном, с недоступностью для использования на территории РФ. Использование клеточных линий зелёной мартышки VERO, CV, Marc 145, MA-104 для культивирования вируса АЧС представляет более простой метод в связи с доступностью данных линий и их неприхотливостью в поддержании. Однако они пригодны для культивирования только адаптированных к ним штаммов и не поддерживают размножение полевых изолятов вируса. Кроме того, адаптация вируса к размножению в данных клетках приводит к появлению значительных изменений в его геноме, влияющих на репродукцию вируса АЧС. Также, следует отметить, что адаптация вируса к клеткам приматов может представлять потенциальную угрозу для человека. Целью данной работы является получение и характеристика новой перевиваемой линии клеток свиньи пригодной для изучения репродукции вируса АЧС клетках хозяина.

Совместно с Всероссийским научно-исследовательским институтом экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) было проведено исследование новой клеточной линии SSs, выделенной из селезёнки свиньи. Показано, что эти клетки успешно поддерживают размножение и обеспечивают высокий уровень репликации вирулентных полевых изолятов вируса АЧС (> $10^{7,0}$ $TCID_{50}$/мл). Кроме того, репликация вируса АЧС в клетках SSs сопровождается характерными для него феноменами гемадсорбции и цитопатического эффекта. С целью определения, к какому типу ткани селезёнки принадлежат клетки линии SSs, методом ПЦР в реальном времени был проведён анализ транскриптов ряда маркерных генов и также определён уровень экспрессии мРНК CD163 и Siglec1, рецепторов макрофагов, предположительно, определяющих селективное узнавание клетки хозяина вирусом. Результаты анализа указывают на принадлежность клеток SSs к фибробастоподобным клеткам белой стромы селезенки.

Однако, было отмечено, что с увеличением пассажей клетки теряли пролиферативную активность, изменяли морфологию и погибали. Следовательно, оригинальная линия SSs не является перевиваемой, что значительно ограничивает её использование. С целью создания перевиваемых линий SSs, клетки были трансформированы плазмидами кодирующими известные факторы иммортализации: теломеразу человека (hTert) и Т-антиген вируса SV40. Показано, что полученные линии клеток hTert SSs и T-SV40 SSs обладают неограниченным делением, ускоренной по сравнению с клетками SSs пролиферативной активностью и могут эффективно поддерживать репродукцию вируса АЧС, как это было определено методами ПЦР, иммуноцитохимии и анализом цитопатического индекса. Клетки hTert SSs были использованы для получения линий клеток свиньи

со стабильной экспрессией химерной прокаспазы-3 и вирусной протеазы pS273R. Полученные перевиваемые линии клеток свиньи hTert SSs и T-SV40 SSs могут быть использованы как для генетических манипуляций, так и для поддержания эффективной репродукции вируса АЧС в культуре клеток.

Данная работа выполнена в рамках государственного задания №122040500033-8.

Обнаружение и филогенетический анализ гомологов PKD-доменов Hoc белка фага RB14 у белков скольжения по поверхности бета-протеобактерий рода *Janthinobacterium*

Зимин А.А.[1*], Никулин Н.А.[1], Дроздов А.Л.[2], Никулина А.Н.[1]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток
*zimin@ibpm.pushchino.ru

Ключевые слова: белок Hoc, Северный Ледовитый океан, PKD-домены, *Janthinobacterium*, бактериофаг RB14, BLASTp, MegaX

Считается, что микроорганизмы с крайне низкой численностью могут спорадически становиться многочисленными под воздействием экологических факторов. Такие вспышки численности редко фиксировались научными методами. Поэтому неясно, что является причиной этих явлений. В арктических морских водах в 2008 году наблюдалось массовое размножение широко распространенной на суше в горах *Janthinobacterium sp.*, относящихся к *Betaproteobacteria*. Популяция *Janthinobacterium* сначала не была обнаружена микроскопически *in situ* в январе и начале февраля 2008 года, но затем внезапно появилась в толще воды и составляла до 20% от всех бактериальных клеток к середине февраля на глубине до 300 м. Это событие является одним из крупнейших моноспецифических бактериальных цветений, зарегистрированных в полярных океанах (1). *Janthinobacterium* чаще встречаются в других местообитаниях и ранее редко обнаруживались в образцах морской воды в полярных океанах. Арктические *Janthinobacterium* образовывают слизеобразные монослоевые агрегаты, что позволяет предположить, что образование биопленки может играть роль в поддержании данных бактерий в пелагических морских условиях. Мы предположили, что на взаимодействие бактерий со льдом и формирование биопленок могло повлиять наличие у *Janthinobacterium sp.* иммуноглобулинподобных PKD-доменов наружных белков клеточной стенки. Например, иммунноглобулинподобные PKD-домены декоративных белков капсида (Hoc) ряда бактериофагов могут быть ответственными за агрегацию частиц друг с другом или поверхностями клеток как бактерий, так и эукариот – например с клетками в кишечнике животного (4). Исследования схожести иммуноглобулин-подобных доменов декоративных белков бактериофагов и бактерий могут дать понимание о происхождении и функции иммунноглобулинподобных PKD-доменов у микроорганизмов. Для сравнительного анализа с белками бета-протеобактерии рода *Janthinobacterium* мы использовали последовательность первого и второго Ig-доменов Hoc белка бактериофага RB14. Сравнительный анализ алгоритмом BLASTp (2) базы данных NCBI выявил 60 хитов. Для дальнейшего исследования с помощью пакета программ MegaX (3) мы использовали наиболее сходные 8 последовательностей с показателем E от 1e-06 до 0.081 и процентом идентичности от 25.55% до 31.91%. В качестве реперных последовательностей мы взяли Hoc - белки бактериофагов, в разной степени сходные с Hoc бактериофага RB14. Филогенетическое дерево, полученное методом Minimum Evolution представлено на рисунке 1. Ряд доменов белков *Janthinobacterium lividum*, ответственных за скольжение по поверхности проявили наибольшее сходство с первым иммуноглобулин подобным доменом белка Hoc бактериофага аэромонад 44RR2.8t. Белок *Janthinobacterium lividum*, содержащий PKD-домены, оказался наиболее близок к Hoc-белку Escherichia phage vB_EcoM_PTE-Eco05, а Hoc белок бактериофагов ацинетобактерий Melvin и Minot, а также фага кронобактерии S13 проявили наибольшее сходство с С-концевой частью белка скольжения MGI4864298.1 в районе 508-659 аминокислот.

Таким образом, анализ показал, что есть ряд сходств аминокислотных последовательностей PKD-доменов *Janthinobacterium sp* и PKD-доменов декоративных белков капсида ряда бактериофагов аэромонад и ацинетобактерий. Выявленные сходства требуют дальнейшего изучения для уточнения функций и структурных особенностей PKD-доменов *Janthinobacterium sp.*, в частности для подтверждения их роли в формировании биопленок.

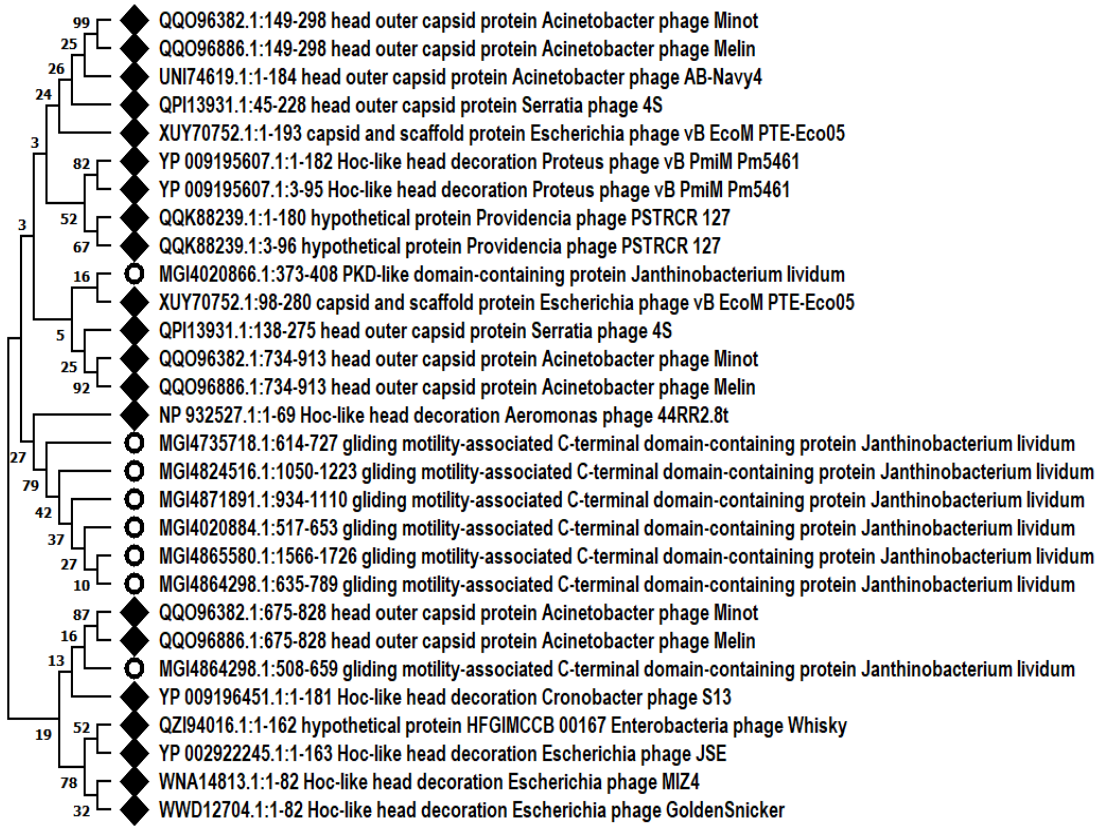


Рис 1. Филогенетический анализ белков *Janthinobacterium lividum* (отмечены кружками) и белков Hoc бактериофагов (отмечены ромбами) методом Minimum Evolution в пакете программ MegaX [3]

Список литературы:

1. Alonso-Sáez L, Zeder M, Harding T, Pernthaler J, Lovejoy C, Bertilsson S, Pedrós-Alió C. Winter bloom of a rare betaproteobacterium in the Arctic Ocean. Front Microbiol. 2014 Aug 20;5:425. doi: 10.3389/fmicb.2014.00425.

2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

3. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018 Jun 1;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

4. Fokine A, Islam MZ, Fang Q, Chen Z, Sun L, Rao VB. Structure and Function of Hoc-A Novel Environment Sensing Device Encoded by T4 and Other Bacteriophages. Viruses. 2023 Jul 7;15(7):1517. doi: 10.3390/v15071517.

Сравнительные исследования АТФ – зависимых ДНК – лигаз бактериофагов T4, RB49 и ДНК-лигазы плазмиды морской бактерии Alteromonas mediterranea

Зимин А.А.[1], Рязанцев М.А.[2], Дроздов А.Л.[3], Сузина Н.Е.[1]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] ПущГЕНИ – филиал Университета «РОСБИОТЕХ», г. Пущино, Российская Федерация
[3] Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток
zimin@ibpm.pushchino.ru

Ключевые слова: нетрансдуцирующий бактериофаг T4, трансдуцирующий бактериофаг RB49, ДНК-лигаза, плазмид морской бактерии Alteromonas mediterranea

ДНК-лигазы являются одними из ключевых ферментов метаболизма ДНК и принимают участие в процессах репликации, репарации и рекомбинации у всех живых организмов (1). Вместе с РНК-лигазами и мРНК-кэпирующими ферментами, ДНК-лигазы формируют группу ковалентных нуклеотидилтрансфераз (2,3). ДНК-лигазы могут быть разделены на два семейства ферментов в соответствии с используемыми кофакторами, АТФ-зависимые (EC 6.5.1.1) и НАД-зависимые лигазы (EC 6.5.1.2) (1-8). АТФ-зависимые ДНК-лигазы найдены в бактериофагах, некоторых бактериях, археях, эукариотах и эукариотических вирусах, в то время как НАД+-зависимые ДНК-лигазы встречаются в основном у бактерий (5,6). ДНК-лигазы, РНК-лигазы бактериофага T4 широко используются в генной инженерии и ряде методов секвенирования нового поколения (NGS). В ряде методов NGS вместо создания второй цепи, как в подходе секвенирования путём полимеразного копирования, используют чувствительность ДНК-лигазы к несовпадениям для определения основной последовательности молекулы целевой ДНК. В некоторых случаях наблюдается недостаточная или избыточная репрезентативность количественного определения микро-РНК с помощью NGS по сравнению с данными кПЦР или микрочипов. Смещение последовательности при использовании лигаз для присоединения адаптеров было отмечено при использовании как T4 РНК-лигаз, так и модифицированной версии T4Rnl2. Смещение было более выраженное на этапе лигирования 5'-адаптера, вероятно, связано со конкретной структурой ДНК/РНК, а не последовательностью. Для модификации РНК-лигаз T4 с целью получения новых лигаз с новой или иной субстратной специфичностью и активностью лигирования могут быть использованы домены различных других ДНК-лигаз.

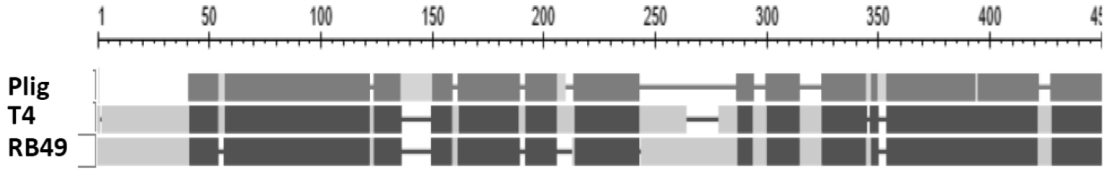


Рис 1. Множественный элаймент ДНК-лигаз бактериофагов T4, RB49 и ДНК-лигазы LigE плазмиды Alteromonas mediterranea программным средством COBALT NCBI.

Сравнительный анализ последовательностей и расположения их доменов у удаленных эволюционно друг от друга ДНК-лигаз и являлся задачей данной работы. Основным объектом была выбрана короткая последовательность ДНК-лигазы LigE плазмиды Alteromonas mediterranea длиной 384 аминокислоты. Большинство минимальных ДНК-лигаз типа Lig E не имеют каких-либо присоединяющихся доменов или неструктурированных петель, необходимых для полного обхвата ДНК-дуплекса в процессе катализа. Множественное наложение АТФ-зависимых ДНК-лигаз бактериофагов, трасдуцирующего RB49 и нетрансдуцирующего T4 на последовательность плазмидной ДНК-лигазы выявило ряд брешей в этом элайменте, которые вероятно соответствуют поверхностным структурам длинных ДНК-лигаз бактериофагов. Эти поверхностные структуры позволяют большую лабильность конформационных изменений в структуре этих ферментов при взаимодействии с ДНК, и должны быть учтены при вырезании доменов для модификации РНК-лигаз T4 при их модификации. Это исследование также существенно для выявления эволюционно

консервативных и лабильных районов в данных ферментах для использования их генов в качестве ПЦР-маркеров для селекции трансдуцирующих и нетрансдуцирующих бактериофагов при конструировании терапевтических наборов фагов для контроля колибактериоза в ветеринарии. Одновременно проведен PSI-BLAST-поиск гомологов плазмидной ДНК-лигазы в метагеноме осадочной микробиоты Замка Локи и было выявлено 17 гомологов. С помощью MegaX мы исследовали сходство этих аминокислотных последовательностей осадочной глубоководной микробиоты с ДНК-лигазами бактериофагов. Было обнаружено, что 11 гомологов существенно эволюционно удалены от каких-либо фаговых ДНК-лигаз, и, что 6 гомологов плазмидной ДНК-лигазы сходны с ДНК-лигазами бактериофагов Ochrobactrum phage vB OspM OC и Ruegeria phage RpAliso. Домены, ответственные за связывание ДНК из последовательностей этих гомологов также могут быть использованы для модификации полинуклеотидлигаз фага Т4 для улучшения точности NGS.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00205, https://rscf.ru/project/24-26-00205/

Список литературы:

1. Timson, D. J., Singleton, M. R. and Wigley, D. B. (2000) ‘DNA ligases in the repair and replication of DNA’, Mutation Research - DNA Repair. Elsevier, pp. 301–318. doi: 10.1016/S0921-8777(00)00033-1.

2. Shuman, S. and Lima, C. D. (2004) ‘The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases’, Curr Opin Struct Biol, 14(6), pp. 757–764. doi:10.1016/j.sbi.2004.10.006.

3. Shuman, S. and Schwer, B. (1995) RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalentnucleotidyl transferases, Molecular Microbiology. Wiley/Blackwell (10.1111). doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17030405.x.

4. Shi, K. et al. (2018) ‘T4 DNA ligase structure reveals a prototypical ATP-dependent ligase with aunique mode of sliding clamp interaction’, Nucleic Acids Research, 46(19), pp. 10474–10488. doi:10.1093/nar/gky776.

5. Gong, C. et al. (2004) ‘Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria.’,The Journal of biological chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology,279(20), pp. 20594–606. doi: 10.1074/jbc.M401841200.

6. Cheng, C. and Shuman, S. (1997) ‘Characterization of an ATP-dependent DNA ligase encoded by Haemophilus influenzae’, Nucleic Acids Research. Oxford University Press, 25(7), pp. 1369–1374.doi: 10.1093/nar/25.7.1369.

7. Tomkinson, A. E. and Levin, D. S. (1997) ‘Mammalian DNA ligases’, BioEssays. Wiley SubscriptionServices, Inc., A Wiley Company, 19(10), pp. 893–901. doi: 10.1002/bies.950191009.

8. Thomson, D. W., Bracken, C. P. and Goodall, G. J. (2011) ‘Experimental strategies for microRNA target identification’, Nucleic acids research. Oxford University Press, 39(16), pp. 6845–53. doi:10.1093/nar/gkr330.

Устойчивость к тетрациклину: так ли всё просто с генами резистентности

Измалкова Т. Ю., Грановский И.Э., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А.

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

Ключевые слова: устойчивость к антибиотикам, тетрациклин, псевдомонады, плазмиды, группы несовместимости плазмид.

Плазмида pD4A-46 размером 150 т.п.н. была обнаружена в мультирезистентном штамме *Pseudomonas fluorescens*, изолированном с песчанно-грунтового покрытия детской площадки г. Пущино, и на основании ПЦР-тестирования со специфичными праймерами к *rep*-области была отнесена к группе несовместимости P-7. Коньюгационный перенос pD4A-46 в бесплазмидный штамм *P. putida* KT2442 обеспечил устойчивость трансконьюгантов к тетрациклину в концентрации в среде 30 мкг/мл. В настоящий момент это единственная IncP-7 плазмида устойчивости к данному классу антибиотиков.

Нуклеотидную последовательность pD4A-46 определили на платформе Illumina (MiSeq). Сборку осуществляли при помощи ассемблера Unicycler. Аннотирование проводили при помощи Prokka. Размер полученной последовательности pD4A-46 составил 150028 п.н., в составе выявлено 192 открытые рамки считывания. На основании анализа нуклеотидной последовательности, плазмида pD4A-46 отнесена к α-подгруппе IncP-7, репликон pD4A-46 относится к pCAR-типу.

Установлено, что данная плазмида не содержит известных генов антибиотикорезистентности. Были выбраны плазмидные гены-кандидаты, предположительно ответственные за резистентность штамма-хозяина pD4A-46 к тетрациклину, и проведён анализ их экспрессии в клетках штамма реципиента *P. putida* KT2442 (pD4A-46). В результате анализа был составлен профиль экспрессии исследуемых генов в зависимости от наличия тетрациклина в культуральной среде и отмечены возможные кандидаты на роль детерминант устойчивости к тетрациклину, кодируемых плазмидой pD4A-46. Анализ изменения относительного содержания мРНК в клетках, выращенных в присутствии различных концентраций тетрациклина позволил сделать вывод о влиянии на устойчивость *P. putida* KT2442 (pD4A-46) к тетрациклину следующих систем: токсин-антитоксин II типа ChpB/ChpS, orfX/GNAT и ассоциированной с мембраной фосфолипид фосфатазы. Возможно, что данная устойчивость является неспецифической и обеспечивается совместной работой всех трёх систем, локализованных на плазмиде pD4A-46. Исследование влияния различных концентраций антибиотика на скорость роста штамма *P. putida* KT2442, содержащего плазмиду pD4A-46, подтверждает неспецифический характер устойчивости.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, Госзадание №FMRM-2022-0014.

Влияние осмотического стресса на уровень глутатиона в клетках *Azotobacter vinelandii*

Калашникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

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

Ключевые слова: глутатион, осмотический стресс, *A. vinelandii*

Бактерии рода Azotobacter являются типичными представителями почвенной микрофлоры и играют значимую роль в улучшении минерального питания растений, стимуляции их роста, а также подавляют развитие фитопатогенной микрофлоры (Aasfar A., 2021, Nongthombam J. et al., 2021). Однако в естественных условиях обитания такие микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов. Одним из основных механизмов защиты данных

бактерий от различного рода стрессовых условий является поддержание оптимального уровня и редокс-статуса низкомолекулярных тиолов, в т.ч глутатиона. В настоящий момент изменения уровней тиолов и механизмы их регуляции в клетках бактерий Azotobacter при различных стрессах недостаточно изучены. Исходя из этого целью настоящей работы было изучить изменения уровня глутатиона в клетках *A. vinelandii* в ответ на осмотический стресс.

Объектом исследований служил штамм *A. vinelandii* VKM B-1273 из коллекции ВКМ. Бактерии выращивали на минимальной среде М9 ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ – 15.13 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, NaCl – 0.5 г/л, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.246 г/л, $CaCl_2$ – 0.011 г/л) с глюкозой (0.4%) и среде Burk (KH_2PO_4 – 0.2 г/л, K_2HPO_4 – 0.8, NH_4Cl – 0.9 г/л, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.2 г/л, $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ – 0.09 г/л, K_2MoO_4 – 0.001 mM, $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 5 мг/л) с сахарозой (20 г/л) в течение 18 ч. Ночную культуру разбавляли в 100 мл свежей среды до начальной плотности OD_{600} 0.15 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (150 об/мин) при 37°C на среде М9 и 30°C на среде Burk до OD_{600} 0.4, после чего в среду вносили NaCl в концентрациях 0.3 и 0.6 М в случае роста на среде М9 и 0.15 и 0.3 М – на среде Burk, инкубацию продолжали в течение двух часов. Периодически отбирали пробы для определения OD_{600} и глутатиона внутри и снаружи клеток. Удельную скорость роста клеток вычисляли по формуле: $\mu = \Delta \ln OD_{600}/\Delta t$. Глутатион измеряли спектрофотометрическим циклическим методом Tietze (Tietze F., 1969), используя реагент дитионитробензоат (DTNB) и глутатионредуктазу.

Осмотический стресс, вызванный добавлением NaCl к растущей культуре, приводил к резкому дозозависимому ингибированию роста через 15 мин после начала воздействия. Впоследствии рост клеток возобновлялся, о чем свидетельствует повышение скорости роста, вплоть до контрольных значений в случае с 0.15 М NaCl. При росте на среде М9 стресс вызывал снижение уровня внутриклеточного глутатиона (GSHin) через 60 мин при добавлении 0.3 М NaCl и через 15 мин при добавлении 0.6 М NaCl относительно контрольных значений. Наибольшие отличия в концентрации GSHin наблюдались при воздействии 0.6 М NaCl, в этих условиях через 90 мин уровень глутатиона был ниже в 2.3 раза. Также было обнаружено, что при выращивании культуры на среде Burk наблюдалась обратная ситуация, осмотический стресс, вызванный 0.3 М NaCl не оказывал влияния на концентрацию глутатиона в клетках. Значимое повышение уровня было характерно для низкой концентрации NaCl (0.15 М), в этом случае концентрация GSHin была в среднем выше в 1.4 раза. Отсутствие различий в уровне внеклеточного глутатитона (GSHout) в контрольных и опытных условиях свидетельствует, что выхода глутатиона из клеток в ответ на стресс не происходило.

Таким образом, было выявлено, что осмотический стресс вызывает изменения в метаболизме глутатиона, при этом характер этих изменений зависит от дозы стрессового фактора, а также от состава среды.

Список литературы:

1. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroua Y., Kadmiri I.M. Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. // Front. Microbiol. – 2021. – V. 12.

2. Nongthombam J., Kumar A., Sharma S., Ahmed S. *Azotobacter*: A Complete Review // Bull. Env. Pharmacol. Life Sci. – 2021. – V. 10 [6]. – P. 72-79.
3. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // Anal. Biochem. – 1969. – V. 27. – P. 502–522.

Специфичность действия перспективных для биомедицины бактериолитических ферментов Blp и Ami *Lysobacter capsici* XL1

Кудрякова И.В.[1], Афошин А.С.[1], Иванков Д.Н.[2], Булавко Е.С[2], Леонтьевская Е.А.[1], Леонтьевская Н.В.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2]Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий
kudryakovairina@yandex.ru

Ключевые слова: бактериолитические ферменты; *Lysobacter*; взаимодействие «бактериолитический фермент – клетка-мишень»; хемотипы пептидогликанов бактерий

Современная проблема глобального масштаба – катастрофический рост количества антибиотико-резистентных бактерий. В связи с этим поиск и изучение новых литических агентов – вызов современной биомедицины. Одними из таких перспективных литических агентов являются бактериолитические ферменты, которые гидролизуют основной компонент бактериальной клеточной стенки – пептидогликан.

Лаборатория биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН единственная в мире, которая занимается поиском, выделением и всесторонней характеристикой внеклеточных бактериолитических ферментов самого активного их продуцента – *L. capsici*. К настоящему времени из культуральной жидкости штамма XL1 нами выделено 13 бактериолитических ферментов, среди которых наиболее перспективными являются бактериолитическая протеаза Blp и амидаза Ami. Blp обладает мощным литическим действием в отношении патогенных бактерий рода *Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus*, включая антибиотико-резистентные штаммы. Ami активна в отношении бактерий рода *Bacillus*, включая патогенные штаммы *B. anthracis*, содержащие плазмиды вирулентности и иммуногенности, а также *B. cereus* с гемолитической и фосфатазной активностями. Для обоих ферментов ранее нами были разработаны гомологичные системы экспрессии на основе клеток *L. capsici* XL1. Это позволяет нарабатывать целевые белки в достаточном количестве для их всестороннего изучения. Целью данной работы было установить химические связи, которые гидролизуют бактериолитическая протеаза Blp и амидаза Ami *L. capsici* XL1 в пептидогиканах разных хемотипов: A1γ у *Bacillus cereus* 217, A2 у *Micrococcus luteus* Ac-2230^T, A3α у *Staphylococcus aureus* 209P, A4α у *Enterococcus faecium* FS86. Пептидогликан типа A1γ характерен также для всех грамотрицательных бактерий.

Пептидогликаны получали методом Шоу [1]. Качество и чистоту полученных петидогликанов контролировали с использованием аминокислотного анализатора. Полученные пептидогликаны использовали в качестве субстрата. После ферментативного гидролиза с использованием методов динитрофенилирования и гидразинолиза определяли свободные NH_2 – группы и COOH – группы соответственно. Аминокислоты и их производные анализировали методом ТСХ. В результате было установлено, что Ami гидролизует во всех исследуемых пептидогликанах исключительно амидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-Ala – первой аминокислотой пептидного ствола. Эти экспериментальные данные подтвердили биоинформатическое предсказание, что Ami является N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазой. Для Blp было установлено, что фермент гидролизует пептидные связи Gly-Gly и Gly-D-Ala в пептидогликане *S. aureus* 209P, L-Ala-D-Ala у *M. luteus* Ac-2230^T, D-Asp-D-Ala у *E. faecium* FS86. Способность Blp гидролизовать связь D-Asp – D-Ala показана впервые.

С помощью программы AlphaFold III предсказана структура Ami. Установлено, что Ami имеет двухдоменную организацию: каталитический домен и субстратсвязывающий домен, соединенные линкером. Двухдоменная организация у внеклеточной амидазы грамотрицательной бактерии показана впервые. Субстратсвязывающий домен Ami является новым и ранее не изученным. В дальнейшем планируется его изучение.

С использованием методов молекулярной динамики предсказаны а.о. Blp , которые могут участвовать в его взаимодействии с углеводной частью пептидогликана: участок N136 – N167. Мутация Y160R привела к ухудшению связывания Blp с пептидогликаном *S. aureus* 209P и снижению бактериолитической активности. В дальнейшем планируется продолжить изучение

других а.о. Blp, которые могут отвечать за его связывание/взаимодействие с пептидогликаном и живыми бактериальными клетками.

Таким образом, дальнейшее изучение взаимодействия бактериолитических ферментов с клетками-мишенями позволит понять его механизм, который до сих пор не изучен, а также разработать подходы к направленному улучшению свойств бактериолитических ферментов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-75-10078, https://rscf.ru/project/24-75-10078/.

Список литературы:

1. Shaw D.R., Mirelman D., Chatterjee A.N., Park J.T. Ribitol teichoic acid synthesis in bacteriophage resistant mutant of *Staphylococcus aureus* H // J Biol Chem. 1970. V.245. P. 5101 – 5106.

Сравнительное исследование структурно-функциональных свойств метионин сульфоксимин ацетилтрансфераз бактерий *Thermus thermophilus* и *Salmonella enterica*

Кудряшов Т.А., Трунилина М.В., Соколов А.С., Лаптева Ю.С.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН)
kudryashovtimm@gmail.com, masha.trunilina@mail.ru

Исследование ко- и посттрансляционных модификаций белков представляет собой важную область научных исследований, учитывая их фундаментальную роль в клеточных процессах и связь с различными патологиями. Ранее нами было проведено детальное изучение Nα-ацетилтрансферазы (NAT) TTHA1209, выделенной из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* HB8. Функциональная активность рекомбинантного белка была подтверждена в реакции in vitro с использованием рекомбинантного α-парвальбумина крысы в качестве субстрата. Биофизическая характеристика фермента показала, что TTHA1209 является термостабильным гомодимерным белком с широким диапазоном стабильности pH (от 2 до 12) и устойчивостью к гуанидин гидрохлориду до 3,07 М. Эти свойства делают TTHA1209 перспективным кандидатом для дальнейших исследований в качестве нового представителя NAT термофилов и возможного биотехнологического инструмента. Биоинформатический анализ выявил структурное сходство белка TTHA1209 с представителями семейства MnaT, отвечающих за регуляцию метаболизма L-аминокислот, в частности, классу MddA/YncA, представители которого ацетилируют L-метионин и его производные, токсичные для клеток.

Основной целью данного исследования являлось определение ферментативной активности TTHA1209 в отношении производных метионина, таких как метионин-сульфоксимин (MSX) и метионин-сульфон (MSO).

В процессе изучения фермента TTHA1209 из *T. thermophilus* HB8, был аннотирован белок MddA (ранее YncA) из *Salmonella enterica*, являющегося гомологом исследуемого фермента. Нами было осуществлено клонирование гена, кодирующего белок MddA, в экспрессионный вектор pET-29, его наработка в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) и очистка с использованием Ni-NTA агарозы. Для MddA была охарактеризована ферментативная активность в отношении производных метионина.

Таким образом, нами проведен детальный анализ кинетических параметров функционирования TTHA1209 и MddA для установления корреляции между наличием метионин-сульфоксимин-связывающего домена и ферментативной активностью, что позволило более глубоко понять механизмы функционирования этих ферментов.

10.24412/cl-37448-2025-1-070

Белки PHO-пути как участники адаптационных процессов у *Saccharomyces cerevisia*

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

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

Ключевые слова: неорганические полифосфаты, дрожжи, полифосфатаза, Vtc4, переносчик фосфата, стресс.

Представление о важной роли неорганических полифосфатов в стрессовой адаптации микроорганизмов получило в настоящее время широкое признание. Целью работы была оценка участия переносчиков фосфата и ферментов метаболизма неорганических полифосфатов в адаптации клеток *Saccharomyces cerevisiae* к стрессам, не связанным с изменениями концентрации фосфата в среде. Используя коммерческие штаммы *S. cerevisiae* с нокаут-мутациями в генах PHO-пути, а также имеющиеся в лабораторной коллекции штаммы-оверэкспрессоры четырех дрожжевых полифосфатаз, мы сравнили способность клеток этих штаммов и родительского штамма к росту и образованию полифосфатов при воздействии токсических концентраций ионов марганца, щелочи и перекиси водорода.

У *S. cerevisiae* имеются четыре полифосфатазы, локализованные в разных компартментах клетки и по-разному действующие на полифосфаты. Полифосфатаза Ppx1 представляет собой экзополифосфатазу, отщепляющую фосфорный остаток с конца молекулы. Полифосфатазы Ppn2 и Ddp1 – это эндополифосфатазы, расщепляющие молекулу полифосфата на более короткие цепи. Полифосфатаза Ppn1 способна проявлять как экзополифосфатазную, так и эндополифосфатазную активность. Нокаут-мутанты, лишенные двух наиболее активным полифосфатаз, Ppn1 и Ppn2, содержали больше полифосфатов, и были более устойчивы к ионам марганца и окислительному стрессу. Однако, штамм Δ*vtc4*, с нокаутом гена, кодирующего полифосфатсинтазу и значительно сниженным уровнем полифосфатов, обладал повышенной устойчивостью к перекиси и ионам марганца. Штаммы-оверэкспрессоры полифосфатаз проверили в тех же экспериментальных условиях и теми же методами экстракции и анализа устойчивости по ингибированию роста и получили следующие результаты:

- уровень полифосфатов в клетках трех штаммов-оверэкспрессоров уменьшился, и только в клетках штамма-оверэкспрессора Ddp1 остался без изменений;
- штаммы с оверэкспрессией полифосфатаз Ppn1 и Ppn2 проявляли более высокую устойчивость к щелочи;
- устойчивость штаммов-оверэкспрессоров Ppn1 и Ddp1, отличающихся по содержанию полифосфатов, к ионам марганца и перекиси одинаково возросла.

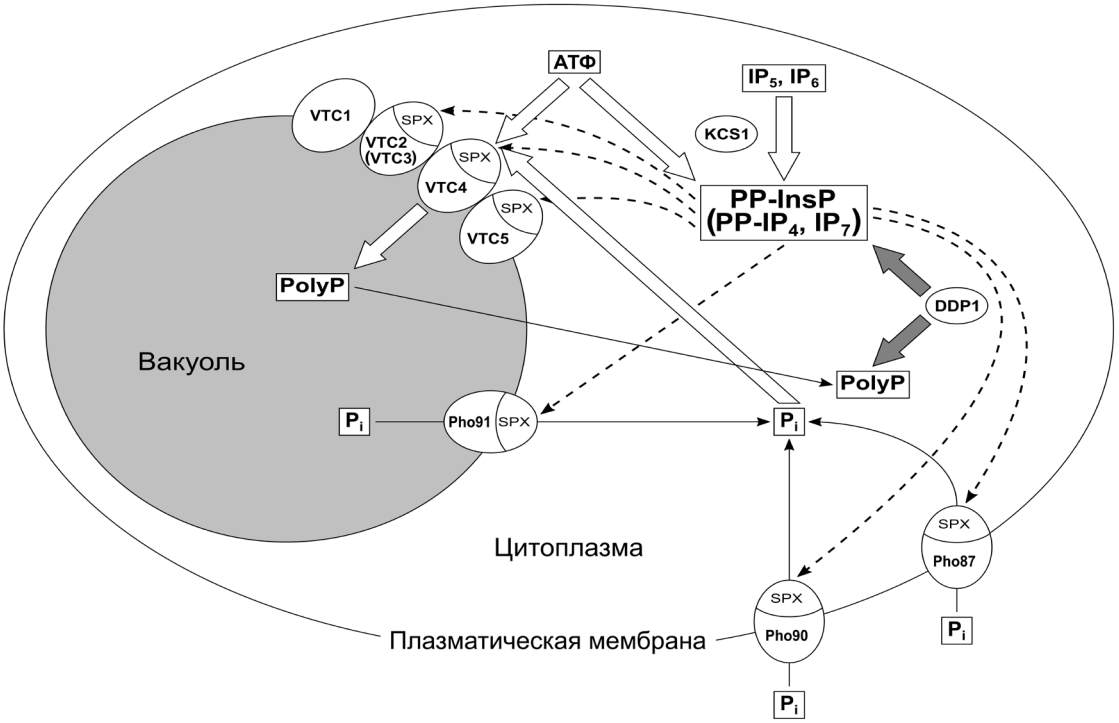
Транскриптомный анализ для штаммов-оверэкспрессоров полифосфатаз Ppn1 (в контроле и в присутствии марганца) и Ppn2 (в контроле и в присутствии щелочи) выявил, что у первого штамма даже без воздействия марганца возрастает экспрессия множества генов, обеспечивающих стрессовый ответ на него, а у второго штамма возрастает экспрессия генов, отвечающих за ответ на щелочной стресс. У мутанта Δ*vtc4* также обнаружено изменение экспрессии некоторых генов, участвующих в адаптации к марганцу.

Таким образом, наблюдаемые изменения устойчивости к стрессам, по-видимому не связаны напрямую с уровнем полифосфатов, а вызваны взаимодействием с сигнальными соединениями клетки, возможно инозитолпирофосфатами, являющимися альтернативными субстратами для Ddp1 и, возможно, для Ppn1.

Для нокаут-мутантов генов, кодирующих переносчики фосфата, также были обнаружены изменения в устойчивости к исследуемым стрессам. Штамм Δ*pho91* с нокаутом гена, кодирующего вакуолярный переносчик фосфата, обладал большей устойчивостью к ионам марганца и перекиси. Клетки штаммов, мутантных по переносчикам фосфата цитоплазматической мембраны Δ*pho84* и Δ*pho87*, были более устойчивы к ионам марганца, а клетки штамма Δ*pho90* - менее устойчивы к ионам марганца.

Согласно литературным данным, ряд белков, ответственных за гомеостаз фосфата, связан не только с транспортом и метаболизмом фосфата и полифосфатов, но и с инозитолпирофосфатами (PP-InsP), которые являются сигнальными молекулами и регуляторами многих процессов. Некоторые из этих белков содержат SPX – домены, обеспечивающие взаимодействие с PP-InsP, а другие, вероятно, способны участвовать в метаболизме сигнальных соединений (Рис.).

Инозитолпирофосфаты – возможные участники стрессового ответа у дрожжей



Итак:

- полифосфаты и белки PHO-пути у дрожжей участвуют в ответе на стрессы, вызванные тяжелыми металлами, окислителями и щелочью;
- участие белков PHO-пути в стрессовом ответе связано с метаболизмом не только полифосфатов, но и сигнальных соединений, предположительно, инозитолпирофосфатов.

Выявление значимых участков последовательности оператора HlyIIR и поиск его потенциальных сайтов связывания в геноме *Bacillus cereus* ATCC 14579

Кульбаев И.С., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Солонин А.С.

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

Ген *hlyII Bacillus cereus* кодирует пороформирующий токсин гемолизин II, экспрессия которого регулируется рядом транскрипционных факторов, в том числе регулятором HlyIIR. Понимание структуры и функции этого оператора, а также выявление генов, потенциально регулируемых HlyIIR, имеет ключевое значение для изучения транскрипционной регуляции в *B. cereus* sensu lato. В данном исследовании определена консенсусная последовательность оператора HlyIIR на основе выравнивания регуляторных областей из различных штаммов *B. cereus* и проведен поиск потенциальных участков связывания в геноме *B. cereus* ATCC 14579 с использованием биоинформатических инструментов.

Оператор HlyIIR гена *hlyII B. cereus* представляет собой 44-нуклеотидный участок с двумя инвертированными повторами [1]. Анализ вариантов мутантных операторов и его центральной области показал, что он состоит из двух участков оператора, с каждым из которых связывается HlyIIR в виде димера [2].

Для выявления генов, потенциально регулируемых HlyIIR, определена консенсусная последовательность его оператора. На первом этапе регуляторные области гена *hlyII* из различных штаммов микроорганизмов группы *B. cereus*, содержащих полные последовательности *hlyII* и *hlyIIR*, были выравнены с использованием последовательности оператора HlyIIR из штамма *B. cereus* B-771 в программе Clustal Omega [3]. Выравненные последовательности были использованы для создания диаграммы распределения нуклеотидов оператора HlyIIR с помощью программы WebLogo. Последовательность оператора, связываемая HlyIIR, соответствует ранее опубликованным данным.

Анализ оператора HlyIIR (44 п.н.) показал, что его центральная область (нуклеотиды 21–25) – наиболее изменчивая, с часто нарушенной палиндромной симметрией. Наиболее консервативные последовательности – TTTAAA (повторяются 4 раза), а также CAA (нуклеотиды 7–9) и их комплементарная последовательность TTG (нуклеотиды 36–38). Однако результаты направленного мутагенеза выявили два участка TTTAAA, разделённые 7 нуклеотидами, как критически важные для каждого участка оператора [4]. Рассматривается возможность участия нуклеотидов, расположенных по флангам оператора гена *hlyII* в регуляции его экспрессии.

На втором этапе геном *B. cereus* ATCC 14579 был проанализирован с использованием сервиса UseGalaxy и инструмента Nucleotide subsequence search [5] для выявления последовательностей TTTAAA-(7N)-TTTAAA. Выявлено несколько таких последовательностей, соответствующих примерно половине длины структуры оператора HlyIIR.

Обнаруженные последовательности расположены в промоторно-операторных областях, рядом с транскрипционными терминаторами и внутри кодирующих последовательностей генов. Участки, расположенные в межгенных областях, вероятно могут принимать участие в транскрипционной регуляции. Некоторые предполагаемые операторы расположены перед генами, кодирующими мембранные белки. Часть выявленных последовательностей может функционировать как транскрипционные терминаторы без участия в инициации регуляции транскрипции.

Экспериментальная проверка их связывания с HlyIIR поможет уточнить роль этих участков в транскрипционной регуляции генов *B. cereus* sensu lato.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 24-24-00456.

Список литературы:

1. Budarina Z.I., Nikitin D.V., Zenkin N., Zakharova M., Semenova E., Shlyapnikov M.G., Rodikova E.A., Masyukova S., Ogarkov O., Baida G.E., Solonin A.S., Severinov K. A new Bacillus cereus DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of B. cereus haemolysin II. Microbiology. 2004. V. 150. No. 11. P. 3691–3701. doi:10.1099/mic.0.27142-0

2. Rodikova E.A., Kovalevskiy O.V., Mayorov S.G., Budarina Z.I., Marchenkov V.V., Melnik B.S., Leech A.P., Nikitin D.V., Shlyapnikov M.G., Solonin A.S. Two HlyIIR dimers bind to a long perfect inverted repeat in the operator of the hemolysin II gene from Bacillus cereus.

FEBS Lett. 2007. V. 581. No. 6. P. 1190–1196. doi:10.1016/j.febslet.2007.02.035

3. Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J., Lopez R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. Nucleic Acids Research. 2010. V. 38. No. 2. P. W695–W699, doi:10.1093/nar/gkq313

4. Nagel A.S., Mayorov S.G., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Siunov A.V., Ivanova T.D., Shlyapnikov M.G., Solonin A.S. Structural Features of the HlyIIR Operator of Bacillus cereus Sensu Lato. Russ. J. Genet. 2025. V. 61. P. 910–916.doi:10.1134/S1022795425700449

5. Cock P.J.A., Antao T., Chang J.T., Chapman B.A., Cox C.J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M.J.L. Biopython: freely available Pythontools for computational molecular biology and bioinformatics. Bioinformatics. 2009. V. 25. No. 11. P. 1422–1423. doi:10.1093/bioinformatics/btp163.

Клонирование, экспрессия и характеристика двухдоменной лакказы из актинобактерии *Kibdelosporangium aridum*

Кхан Н.А.[1,2], Трубицина Л.И.[1], Леонтьевский А.А.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2]Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН
nadya.khan@mail.ru

Ключевые слова: двухдоменная лакказа, клонирование, термостабильность.

Двухдоменные лакказы – медьсодержащие оксидазы, обнаруженные у бактерий в начале 2000-х годов, известны своей термостабильностью, широкой субстратной специфичностью и, что самое важное, устойчивостью к так называемым «сильным ингибиторам» классических грибных лакказ (азиды, фториды). Для всех двухдоменных лакказ оказался характерен низкий окислительно-восстановительный потенциал, из-за чего эти ферменты утратили интерес исследователей как потенциально пригодные для различных биотехнологических целей, таких как биоремедиация. Поиск, получение и изучение свойств новых двухдоменных лакказ позволит получить фермент с высоким окислительно-восстановительным потенциалом, что позволит использовать его на практике.

Цель данной работы: экспрессия в бактериальной системе (*Escherichia coli*) и характеристика активной двухдоменной лаккказы из штамма *Kibdelosporanium aridum* ВКМ Ac-1316 (номер аминокислотной последовательности в базе данных NCBI: WP_084425184.1).

Штамм *Kibdelosporanium aridum* ВКМ Ac-1316 был культивирован, выделена геномная ДНК. Были написаны праймеры для ПЦР-амплификации гена лакказы и наработан целевой продукт. Клонирование целевого гена производилось по сайтам эндонуклеаз рестрикции SacI и HindIII в плазмиду pQE-30. Трансформация полученного вектора проводилась в штамм компетентных клеток *E. coli* M15(pREP4). Индукция осуществлялась 0,25 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид). Очистка фермента проводилась методом аффинной хроматографии.

Была исследована активность лакказы KaSL в отношении АБТС (2,2′-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) и 2,6-диметоксифенола. Обнаружено что, модифицированная лакказа окисляла нефенольное органическое соединение АБТС с максимальной скоростью при pH 3,0; фенольное соединение 2,6-диметоксифенол – при pH 9,75. Активность лакказы составила 1,7 Ед/мг белка. Выход лакказы составил 70 мг белка с 1 литра среды. Для измерения термостабильности фермент инкубировали при температурах 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C и при кипячении в течение часа с последующим измерением активности. После часа инкубирования при 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C фермент сохранял 68 %, 55 %, 48 %, 29 % от начальной активности, соответственно. После 15-ти минут кипячения остаточная активность лакказы составила 41 %, после 45-ти минут – 18 % от начальной активности.

Выводы: в геноме актинобактерии *Kibdelosporanium aridum* ВКМ Ac-1316 был идентифицирован ген двухдоменной лакказы; лакказа была успешно продуцирована в штамме *E. coli;* фермент нарабатывался с высоким выходом (70 мг с литра среды) и обладал высокой термостабильностью (сохранял остаточную активность после 45-ти минут кипячения).

Роль ферментов в стабилизации органического вещества почвы

Лисов А.В.1, Трубицина Л.И.[1], Белова О.В.[1], Петракова М.П.[1], Заварзина А.Г.[2], Леонтьевский А.А.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2]Московский государственный университет (Факультет почвоведения)
ssl208@rambler.ru

Органическим веществом почвы (ОВП) называют совокупность гетерогенных и полидисперсных соединений, образующихся при трансформации органических остатков в почвах, а так же неразложившиеся остатки биологического происхождения. Биокаталитическая активность имеет решающее значение для разложения и оборота органического вещества почвы. Ферменты продуцируются почвенными организмами и трансформируют ОВП. Органическое вещество в почве находится как в свободном состоянии, так и в связанном с минералами почвы. Реакции с участием ферментов, ведущие к стабилизации ОВП, изучены мало. До настоящего времени неизученным остаётся взаимодействие ОВН, трансформированного ферментами, с неорганической фракцией почвы.

В геноме бактерии *Streptomyces spiralis* ВКМ Ac-1311 обнаружен ген, потенциально кодирующий ксиланазу семейства GH10. Были написаны параймеры для амплификации гена, ген был получен с помощью ПЦР. Полученный ген ксиланазы был клонирован в вектор pET-19mod, был получен рекомбинантный продуцент фермента на основе *E. coli* Origami™ (DE3). Была проведена наработка и очистка с помощью металл-хелатной хроматографии рекомбинантной ксиланазы. Электрофорез в ПААГ-SDS показал, что молекулярную массу фермента в 45 кДа, что согласуется с теоретически рассчитанной массой 49 кДа. Оптимум pH фермента составил 5,0. Ксиланаза была более стабильна при значениях pH выше 5,0. Температурный оптимум ксиланазы составил 70°C. После часа инкубирования при 70°C фермент сохранял 78% от начальной активности, 22-23% – при инкубировании при 80°C, 90°C и 95°C. Инкубирование при 60°C почти не повлияло на активность фермента. Ксиланаза активно гидролизовала ксилан. При этом в качестве основных продуктов наблюдалось образование ксилозы, ксилобиозы. ксилотриозы. В присутствии минералов, характерных для почв, при концентрациях ксилана ниже 0,1% наблюдалось снижение активности ксиланазы, что говорит о слабой трансформации ксилана, связанного с минералами. Продукты разложения ксилана сорбировались на почвенные минералы слабее, чем исходный ксилан. Таким образом действие ксиланазы на ксилан приводит к снижению его сорбции и, следовательно, доступности.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-14-00152.

Адгезия бактерий *Lactobacillus spp.* в водных растворах хлорида натрия с учетом эффекта осмоса/когезии

Лосев Е.С., Панаит А.И., Погорелов А.А., Станкевич А.А.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
repa-pa@yandex.ru

Известно, что большую часть времени жизненного цикла бактерии существуют в виде биопленок [1]. Бактериальная биопленка – многослойное образование, состоящее из клеток и внеклеточного матрикса, часто прикрепленное к субстрату. Жизненный цикл биопленки подразделяют на стадии: обратимая адгезия (А), необратимая А, созревание и распространение [2]. Снижая вероятность прикрепления бактерии к субстрату, мы можем препятствовать зарождению и распространению бактериальной пленки.

А бактерий к поверхности зависит от: особенностей бактерий, свойств поверхности, характеристик окружающей среды [3]. Процесс А частично описывается теорией DLVO. Теоретические предсказания говорят о том, что при увеличении ионной силы (I) окружающего раствора А бактерий должна увеличится, ряд исследований подтверждает данный постулат [4]. Однако в работе C. Berne с соавторами показано, что увеличение I окружающей среды приводило к изменению структуры адгезинов, нейтрализовало их заряды и тем самым способствовало ослаблению силы взаимодействия бактерий с поверхностями [5].

Бактериальные клетки реагируют на тоничность раствора изменением объема [6]. Также было показано, что в растворах с I в интервале от 1.5 до 50 мМ у некоторых видов рода *Staphylococcus* увеличивается сила когезии, и образуются клеточные конгломераты, которые распадаются при дальнейшем повышении I раствора [7].

В данной работе мы исследовали А бактерий *Lactobacillus spp.* к полистиролу в не забуференных водных растворах NaCl I(M) = {0, 0.04, 0.15, 0.62, 2.46} с учетом эффекта осмоса/когезии. 3-х часовая А бактерий происходила в статических условиях на субстрат, расположенный перпендикулярно силе тяжести при 37°C. Эффективность А (E) рассчитывали по формуле:

$E=1-OD_{550}(t=3)/OD_{550}(t=0)$.

В дистиллированной воде $I(M_{NaCl})=0$ E на полистирол составила 16,3% клеток от исходного количества. Бактерии в 4-х кратно разбавленном физиологическом растворе $I(M_{NaCl})=0.04$ и физиологическом растворе $I(M_{NaCl})=0.15$ адсорбировались более эффективно. Доли прикрепившихся клеток составили 55.7% и 54.2%, соответственно. По мере дальнейшего увеличения ионной силы раствора до $I(M_{NaCl})=0.62$, наблюдали более слабое прикрепление бактерий к субстрату, половина имеющихся клеток села на пластик за 3 часа – 50.1%. Увеличив I среды в 16 раз относительно физиологического раствора $I(M_{NaCl})=2.46$, E снизилась до 32.3%.

Помещая бактериальные клетки, суспендированные в физиологическом растворе, в гипо- ($I=0$ M_{NaCl}), изо- ($I=0.15$ M_{NaCl}) и гиперосмотические $I(M_{NaCl})=\{0.62, 2.46\}$ условия, мы оценивали эффект осмоса/когезии и ввели поправку на исходную концентрацию клеток в суспензиях, приготовленных в растворах $I(M_{NaCl})=\{0.62, 2.46\}$. С учетом того, что E меняется в зависимости от начальной концентрации клеток (см. рис. 1), мы рассчитали коэффициент поправки E. На рис. 2 приведены исходные и рассчитанные с учетом поправок E бактерий в растворах хлорида натрия.

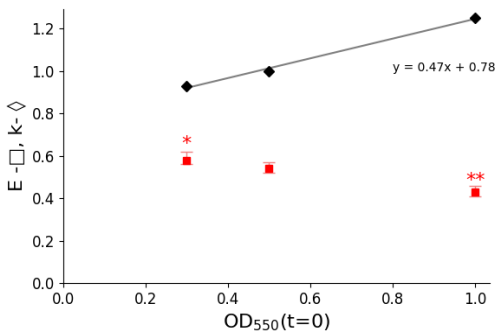


Рис. 1. *Эффективность (E) - □ и коэффициент эффективности (k) ◇ бактериальной адгезии при различной исходной плотности суспензии, приготовленной на физиологическом растворе I=0,15 М. □ - Mdn, n=5. Непараметрический критерий Манна-Уитни: *p<0.05, **p<0.01.*

10.24412/cl-37448-2025-1-077-078

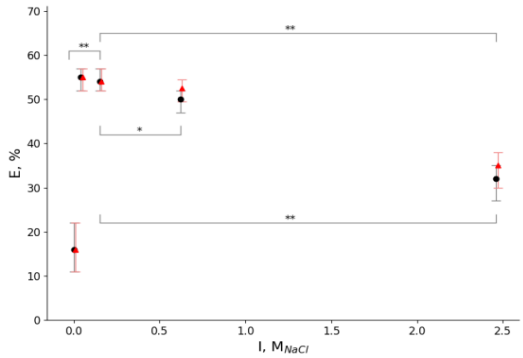


Рис. 2. *Эффективность (E, %) бактериальной адгезии в растворах I(M_{NaCl})={0, 0.04, 0.15, 0.62, 2.46} с поправкой на эффект осмоса/когезии – красный и без – синий. Mdn±IQR, n=5. Непараметрический критерий Манна-Уитни: *p<0.05, **p<0.01.*

Таким образом, с учетом полученных коэффициентов E бактерий в растворах I(M_{NaCl})={0.04, 0.15, 0.62} достоверно не различалась и составила 53,2-55,7%, в дистиллированной воде – 16,3%, в растворе I(M_{NaCl})=2.46 – 35,2%.

Список литературы:

1. Bacterial biofilms in nature and disease. 1987. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Annu Rev Microbiol, 41:435–464.
2. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. 2022. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, Bjarnsholt T. Nat Rev Microbiol, 20:608-620.
3. Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. 2021. Zheng S, Bawazir M, Dhall A, Kim H-E, He L, Heo J, Hwang G. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 643722.
4. Role of ionic strength in the retention and initial attachment of Pseudomonas putida to quartz sand. 2018. Ramezanian S, Ta HX, Muhunthan B, Abu-Lail N. Biointerphases, 13(4), 041005.
5. Bacterial adhesion at the single-cell level. 2018. Berne C, Ellison CK, Ducret A, Brun YV. Nat Rev Microbiol 16:616–627.
6. Physicochemical homeostasis in bacteria. 2023. Poolman B. FEMS Microbiology Reviews, 47:1–7.
7. Role of ionic strength in staphylococcal cell aggregation. 2016. Vanzieleghem T, Couniot N, Herman-Bausier P, Flandre D, Dufrêne YF, Mahillon J. Langmuir, 32:7277-7283.

Скрининг микроорганизмов, способных окислять гидролизный лигнин сосны

Манько К.С.[1], Ренфельд Ж.В.[2], Горина С.Ю.[2], Черных А.М.[2], Довбня Д.В.[2], Донова М.В.[2], Коломыцева М.П.[2]

[1]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова
kirill.limonoff2017@yandex.ru
[2]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН
mkolomytseva@rambler.ru

Ключевые слова: лигнин, грибы, биотрансформация, валоризация, возобновляемые ресурсы, ароматические соединения.

Лигнин – нерегулярный ароматический биополимер сложного строения, входящий в состав лигноцеллюлозного комплекса клеточных стенок растений. Он обеспечивает их механическую прочность, гидрофобность и устойчивость к ферментативной деградации. Как один из основных компонентов растительной биомассы, лигнин представляет собой крупнейший возобновляемый источник ароматических соединений (Bugg, 2024).

Мономеры лигнина – *n*-кумаровый, конифериловый и синаповый – синтезируются в цитозоле посредством фенилпропаноидного пути и затем транспортируются в клеточную стенку. Здесь происходит их радикальная полимеризация, катализируемая пероксидазами и лакказами, с образованием нерегулярного полимерного каркаса. Монолигнолы в лигнине соединены преимущественно простыми эфирными (β-O-4) и C-C связями, что обусловливает его высокую химическую стабильность и устойчивость к деградации. В связи с этим, в деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности лигнин удаляют из биомассы в процессе делигнификации, а полученный технический лигнин, как правило, сжигают для получения энергии или складируют (Brienza et al., 2023).

Тем не менее, структура лигнина делает его перспективным возобновляемым сырьём для получения промышленно ценных ароматических соединений. Одной из наиболее экологичных стратегий переработки лигнина является его биоконверсия с использованием микроорганизмов и их ферментных систем. Способность к деградации лигнина широко распространена среди дереворазрушающих базидиомицетов, таких как грибы белой и бурой гнили, а также среди некоторых аскомицетов (грибов мягкой гнили). Ключевую роль в этом процессе у грибов играют внеклеточные ферменты лигнолитического комплекса, включающие лигнин-пероксидазы (LiP), марганец-пероксидазы (MnP), а также лакказы. Бактерии, способные разрушать лигнин, обнаружены среди представителей альфа- и гамма-протеобактерий, актиномицетов и бацилл. Их способность к модификации и разложению лигнина обеспечивается комплексом оксидоредуктаз, таких как бактериальные пероксидазы, медьсодержащие оксидазы и диоксигеназы (Zhao et al., 2022).

Целью настоящей работы был поиск новых микроорганизмов-деструкторов лигнина. В работе были использованы штаммы из коллекции лаборатории энзиматической деградации органических соединений и Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН.

В ходе работы оценивали рост микроорганизмов в модифицированной жидкой минеральной среде Горлатова с гидролизным лигнином сосны в качестве единственного источника углерода. У ряда грибов был зарегистрирован рост мицелия и способность к обесцвечиванию лигнин-содержащей среды. Спектрофотометрический анализ культуральных жидкостей в процессе погруженного культивирования выявил изменения, свидетельствующие о возможной трансформации лигнина. Определение активности основных ферментов лигнолитическоого комплекса, участвующих в деградации лигнина, показало наличие в культуральной жидкости большинства протестированных базидиомицетов и некоторых аскомицетов лакказной активности.

Анализ методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии показал исчезновение низкомолекулярных фракций лигнина и появление новых соединений в ходе погруженного культивирования грибов. Для дополнительного скрининга активных микроорганизмов использовали хромогенный тест на агаризованной среде с лигнином, основанный на окислении фенольных групп с образованием берлинской лазури. Наиболее активные базидиомицеты продемонстрировали в данном тесте

способность к окислению лигнина. Кроме того, у ряда бактериальных культур также была выявлена возможная лигнин-трансформирующая активность.

Список литературы:

Bugg TDH. The chemical logic of enzymatic lignin degradation. Chem Commun. 2024 Jan 18;60(7):804–14.

Brienza F, Cannella D, Montesdeoca D, Cybulska I, Debecker DP. A guide to lignin valorization in biorefineries: traditional, recent, and forthcoming approaches to convert raw lignocellulose into valuable materials and chemicals. RSC Sustain. 2023;

Zhao L, Zhang J, Zhao D, Jia L, Qin B, Cao X, et al. Biological degradation of lignin: A critical review on progress and perspectives. Industrial Crops and Products. 2022 Nov; 188:115715.

о-Деметил-яваницин - внутриклеточный нафтохиноновый метаболит гриба *Fusarium decemcellulare* VKM F-1179

Меденцев А.Г., Баскунов Б.П., Аринбасарова А.Ю.

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

Ключевые слова: нафтохиноны, о-деметил-яваницин, нафтохиноны, *Fusarium decemcellulare.*

Растения, грибы и актиномицеты [1,2] продуцируют нафтохиноновые метаболиты, которые проявляют широкий спектр биологической активности, включая антимикробную [3], фитотоксическую, и противоопухолевую [3]. Некоторые нафтохиноны вызывают неблагоприятные токсические эффекты у людей и животных и классифицируются как микотоксины [2].

В настоящей работе сообщается о выделении и идентификации нового нафтохинонового метилированного пигмента из мицелия гриба *Fusarium decemcellulare* VKM *F*-1179.

Из мицелия гриба *Fusarium decemcellulare* VKM F-1179 изолирован нафтохиноновый метаболит (1), который на основании физико-химических данных (МС, 1Н-ЯМР, ИК, УФ, идентифицирован как 8-о-деметил-яваници. 8-О-деметил-яваницин, практически не определяется в среде культивирования при pH, равном 3.0 – 4.0 (обнаруживается только при экстракции из отмытого мицелия). При повышении pH до 6.0 -6.5 в культуральной жидкости был обнаружен метилированный метаболит -яваницин.

Идентификация указанного метаболита (2) была осуществлена путем метилирования деметил-яваницина (метаболита 1) диазометаном, а также на основании данных МС, 1Н-ЯМР, ИК, УФ.

Табл. Физико-химические характеристики о-деметил-яваницина и яваницина

Пигмент (условия кристаллизации, температура плавления, R_f)	Спектр поглощения в УФ и видимой областях, $\lambda_{макс}$, нм		ИК-спектр $\nu_{макс}$, $см^{-1}$ (KBr)	Основные интенсивные пики в масс-спектре, m/z, %
	Этанол	Этанол (NaOH)		
о-Деметил-яваницин (красные кристаллы из гексана, 154 – 155 °С; 0,35)	230	230	3425	276 (48)
	310	310	2940	277 (8)
	475	500	2870	235 (15)
	505	535	1740	234 (100)
	544	570	1635	233 (И)
				206 (18)
Яваницин (красные иглы из ацетона, 206-207 °С; 0,65)	230	230	2940	290(69)
	305	305	2840	291 (13)
	475	520	1740	249 (13)
	505	551	1635	248 (100)
	540	588		247(23)
				236(12)

Нами было показано, что яваницин, изолированный из среды культивирования *F. decemcellulare* VKM F-1179, проявляет фитотоксическое и антимикробное действие. Яваницин оказывал токсический эффект на бактерии родов *Pseudomonas, Arthrobacter,* а также грибы *Yarrowia, Torulopsis, Penicillium.* Деметилированное производное, как оказалось, не ингибировал рост указанных микроорганизмов.

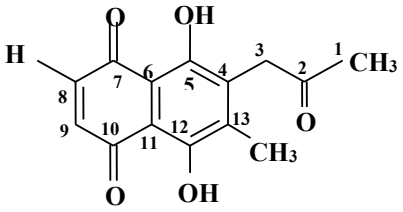
При воздействии на ДТ-диафоразу клеток гороха в присутствии НАД(Ф)Н яваницин акцептирует восстановительные эквиваленты от флавина D,T-диафоразы, после чего происходит самоокисление молекулярным кислородом с образованием активных форм кислорода (O_2^{-1}, H_2O_2). Эта реакция лежит в основе цитотоксического действия нафтохиноновых пигментов. В данной работе установлено, что деметил-яваницин не проявлял способности к взаимодействию с ДТ-диафоразой и образованию активных форм кислорода.

Представленные данные указывают на рациональный механизм синтеза яваницина грибом *F. decemcellulare* VKM F-1179, при котором деметил-яваницин (1) первоначально экспрессируется в виде нетоксичного предшественника, который впоследствии (на стадии выхода из клетки) в результате метилирования превращается в активную токсичную форму – яваницин (2).

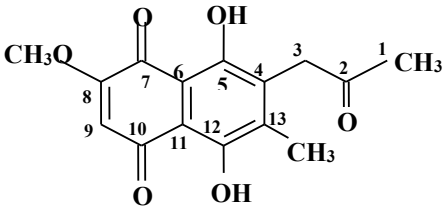
Такая специализированная устойчивость к собственным биологически активным метаболитам является одним из факторов, обеспечивающим преимущество продуценту в конкуренции с другими организмами.

Производные различных нафтохинонов с учетом механизма действия могут быть использованы для получения биологически активных препаратов, которые проявляют антимикробную активность в отношении патогенных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Klebsiella sp., Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas alcaligenes*, что также имеет важное значение для здоровья человека.

8-О-деметил-яваницин (1)



Яваницин (2)



Список литературы:

1. Medentsev, A.G.; Akimenko, V.K. Naphthoquinone metabolites of the fungi. Phytochemistry. 47(1998), pp. 935-959.
2. Bard NW, Cronk QCB, Davies TJ. Fungal endophytes can modulate plant invasion. Biol Rev Camb Philos Soc. 2024 Oct;99(5):1652-1671. doi: 10.1111/brv.13085.
3. Aminin D, Polonik S. 1,4-naphthoquinones: some biological properties and application. Chem Pharm Bull. 2020;68(1):46–57. https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00911.

Пептидогликангидролаза из Gammaproteobacteria bacterium

Микулинская Г.В., Чернышов С.В.

Филиал ГНЦ Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
mikulinskaya@bibch.ru

Ключевые слова: лизис бактерий, пептидогликан, эндолизин, кальций, регуляция.

В хромосоме *Gammaproteobacteria bacterium* при метагеномном секвенировании была обнаружена аминокислотная последовательность PID66617.1 (далее M15Gamma), аннотированная как пептидаза семейства M15. Потенциальный фермент молекулярной массой 16.2 кДа является щелочным белком с расчетным значением pK 9.82; детальный анализ последовательности позволил отнести его к металлопептидазам подсемейства M15_C по классификации Роулингса [1]. Эти пептидазы специфично гидролизуют связь L-Ала-D-Глу в пептидогликане (ПГ) бактерий и имеют в активном центре ион цинка, координированный триадой из двух остатков гистидинов и одного аспартата (здесь H64, D71, H135); каталитической аминокислотой также является аспартат (D132). Наше внимание привлекли две черты потенциального фермента: во-первых, бактериальное происхождение, ведь большинство охарактеризованных представителей подсемейства M15_C – фаговые белки эндолизины, разрушающие ПГ для выхода фагового потомства в конце литического цикла. Во-вторых, M15Gamma имеет кальцийсвязывающую петлю EF-подобного типа, образованную аминокислотными остатками 115-125 и ранее обнаруженную только у двух эндолизинов (EndoT5 и EndoA3) фагов T5 и 3, заражающих грамотрицательные бактерии родов *Escherichia* и *Aeromonas*, соответственно [2,3]. Сродство подобной петли к кальцию низкое, константы диссоциации иона порядка 10^{-4} M; предположительно, активация эндолизинов EndoT5 и EndoA3 с помощью Ca^{2+} происходит в периплазме, являющейся кальциевым «депо», и служит спусковым механизмом лизиса грамотрицательной бактерии изнутри.

Задачами данной работы было клонировать ген M15Gamma, получить растворимый белок, исследовать его пептидогликандеградирующую активность; установить, является ли фермент кальций-зависимым, и сделать предположения о его биологической роли в метаболизме *Gammaproteobacteria bacterium.*

Ген, кодирующий M15Gamma, был получен путем полимеразной цепной реакции, матрицей служил комплект химически синтезированных длинных перекрывающихся праймеров; полученный искусственный ген кодировал последовательность природного белка. Рекомбинантная плазмида, несущая ген, была создана на основе вектора pET28a. Продукцию целевого белка вели в клетках *E. coli* BL21 (DE3), индукцию осуществляли с помощью 0.2 мМ IPTG, клетки растили в течение 4 часов при 37°C; белковый продукт был полностью растворимым и полноразмерным. Активность фермента анализировали турбидиметрическим методом по убыли оптической плотности при 450 нм суспензии клеток *E. coli*, предварительно пермеабилизованных хлороформом, как описано [4]; за единицу активности принимали количество фермента, обеспечивающее уменьшение плотности на 1 ОЕ в минуту.

Было показано, что рекомбинантная M15Gamma действительно является кальций-зависимой пептидогликангидролазой; фермент активен в Трис-HCl-буфере (pH 8.0), причем ионная сила реакционной среды должна быть не менее 200 мМ, что можно обеспечить с помощью нейтральной соли. Кроме того, для проявления литической активности M15Gamma требовалось обязательное добавление экзогенного кальция в среду в концентрации не менее 0.5 мМ; активность достигала максимальной в 10 мМ $CaCl_2$. Следует подчеркнуть, что охарактеризованные ранее кальций-зависимые эндолизины EndoT5 и EndoA3 не требуют экзогенного кальция: для их максимальной активности достаточно ионов Ca^{2+}, содержащихся в клеточной стенке бактерии-субстрата. Напротив, избыток ионов Ca^{2+} неспецифически ингибирует эти ферменты. Таким образом, сродство M15Gamma к Ca^{2+} крайне низкое, однако в отсутствие иона фермент полностью неактивен. Активность M15Gamma не проявлялась ни при добавлении 1-10 мМ Mg^{2+}, ни, что особенно удивительно, в присутствии ионов Mn^{2+}, для которых показана способность эффективно замещать кальций in vitro для других металлозависимых ферментов, включая EndoT5 и EndoA3.

Нужно отметить, что даже при соблюдении оптимальных условий (кальций, ионная сила) максимальная активность M15Gamma была на два порядка ниже, чем у фаговых эндолизинов EndoT5 и EndoA3, составляя 130-150 Ед/мл в осветленном экстракте. Можно предположить, что ген M15Gamma,

попавший в геном бактерии из профага в результате горизонтального переноса, претерпел, в отсутствие эволюционного давления за ненужностью функции своего продукта, ненаправленный мутагенез и является «молчащим». Однако, нельзя исключить, что активация M15Gamma все-таки происходит в богатой кальцием периплазме, и грамотрицательная *Gammaproteobacteria bacterium* адаптировала его к своим целям. Примером такой адаптации является описанная ранее система секреции грамотрицательных бактерий на основе холиноподобного и эндолизиноподобного белков; среди эндолизиноподобдных белков встречаются и L-аланил-D-глутаматпептидазы; эту систему секреции при рассмотрении в обзоре авторы предложили называть Type 10 Secretion System (TXSS) [5]. Прояснить биологическую роль M15Gamma помогут дальнейшие структурно-функциональные исследования.

Список литературы:

1. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A & Finn RD (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Research 46, D624–D632. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134.

2. Kovalenko AO, Chernyshov SV, Kutyshenko VP, Molochkov NV, Prokhorov DA, Odinokova IV & Mikoulinskaia GV (2019) Investigation of the calcium-induced activation of the bacteriophage T5 peptidoglycan hydrolase promoting host cell lysis. Metallomics 11(4), 799-809. https://doi.org/10.1039/c9mt00020h.

3. Mikoulinskaia GV, Chernyshov SV, Tarlachkov SV, Mussayeva AA, Chulin AN, Melnik TN, & Prokhorov DA (2025) Endolysin of Aeromonas bacteriophage 3: a novel Ca2+-activated peptidoglycan hydrolase giving insight into the regulation of phage lysis in Gram-negative bacteria. International journal of biological macromolecules, 322(Pt 3), 146934. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146934

4. Caldentey J & Bamford DH (1992) The lytic enzyme of the Pseudomonas phage phi 6. Purification and biochemical characterization. Biochim Biophys Acta 1159, 44–50. https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90073-m

5. Palmer T, Finney AJ, Saha CK, Atkinson GC & Sargent F (2021) A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. Molecular microbiology, 115(3), 345–355. https://doi.org/10.1111/mmi.14599.

Чувствительность дерматофитов рода Trichophyton к фотодинамическому действию фиолетового (405 нм) светодиодного излучения

Молчанова К.А.[1], Нестерова Т.Б.[2], Тучина Е.С.[1], Нечаева О.В.[3,4], Тучин В.В.[1], Шнайдер Д.А.[2,5]

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Саратов
[2] Государственное учреждение здравоохранения «Саратовский областной клинический кожно-венерологический диспансер» министерства здравоохранения Саратовской области
[4] ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
[5] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России
[5] Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского, Саратов
ksenia13052005@gmail.com

Аннотация. В работе изучено фотодинамическое действие фиолетового (405 нм) на жизнеспособность возбудителя онихомикоза человека: *Trichophyton rubrum* и *T. mentagrophytes*. Показано снижение жизнеспособности *T. rubrum* на 90% после воздействия фиолетовым (405 нм) излучением в течение 15 мин.

Ключевые слова: онихомикозы, дерматофиты, Trichophyton rubrum, синее излучение, 405 нм, фотодинамическое воздействие.

Контагиозность и широкая распространенность онихомикозов требуют разработки инновационных методов лечения грибковых инфекций. Сложности в терапии обусловлены особенностями строения ногтя и возникновением резистентности у некоторых штаммов дерматофитов к противогрибковым средствам. Перспективной альтернативой традиционной терапии может стать фотодинамическое воздействие (ФДВ). Содержание в клетках грибов рода Trichophyton таких пигментов как ксантомегин, виоксантин и виопурпурин, поглощающих излучение в фиолетовой и синей областях спектра, делает их чувствительными к фотодинамическому воздействию, что открывает новые возможности для лечения онихомикозов [1-3].

Целью данной работы стало изучение чувствительности возбудителей онихомикоза человека *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* к фотодинамическому действию фиолетового (405 нм) излучения.

Объектом исследования служили культуры *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* (коллекция бактериологической лаборатории ГУЗ «СОККВД»), выращенные при температуре 28 °С на среде Сабуро. Воздействие осуществляли на фрагменты мицелия, помещенные на поверхность плотной питательной среды. Жизнеспособность культуры оценивали как соотношение площади мицелия (регистрировали с помощью программы Image J для анализа цифровых изображений) у экспериментальных образцов к контрольным и выражали в процентах.

Во всех экспериментах использовали непрерывный режим облучения. Плотность мощности фиолетового (405 нм) источника излучения составляла 180 мВт/см^2, сообщаемые дозы излучения 54 Дж/см^2 (экспозиция 5 мин), 107 Дж/см^2 (экспозиция 10 мин) 160 Дж/см^2 и (экспозиция 15 мин). Все опыты проводились в пятикратной повторности.

Установлено, что воздействие фиолетового (405 нм) излучения на *T. rubrum* в течение 5 мин вызывает снижение жизнеспособности на 10%, после 10 мин – на 18%, после 15 мин – на 90%. Отмечено уменьшение коричнево-красной пигментации мицелия у культур, подвергнутых

воздействию дозы излучения 160 Дж/см^2 (рис. 1).

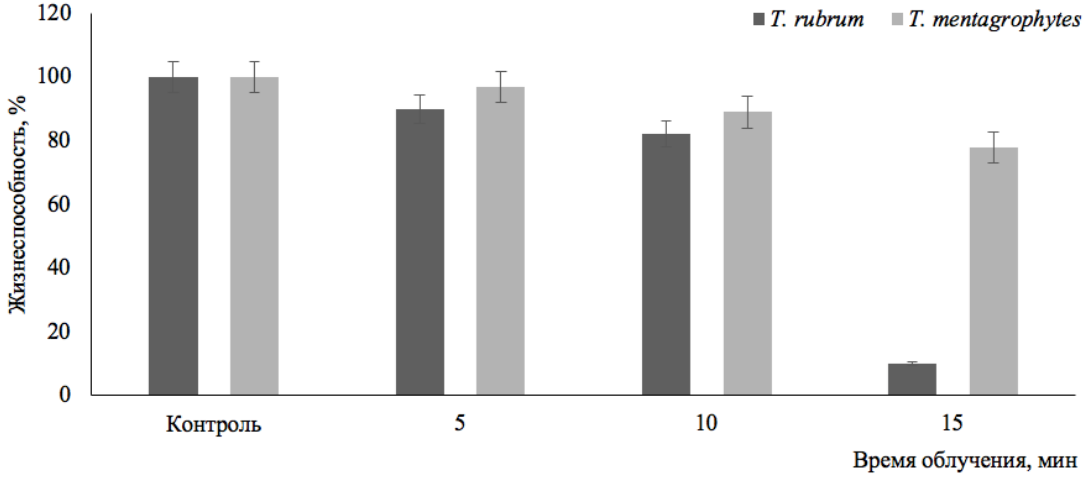


Рис. 1 – Действие фиолетового (405 нм) светодиодного излучения на жизнеспособность грибов рода Trichophyton.

Воздействие с использованием фиолетового (405 нм) излучения на *T. mentagrophytes* обеспечивало незначительный угнетающий эффект. ФДВ в течение 5 мин приводило к снижению жизнеспособности на 3%, после 10 мин – на 11%, после 15 мин – лишь на 22%.

Таким образом, из двух исследованных возбудителей онихомикозов более чувствительным к действию фиолетового (405 нм) излучения оказался *T. rubrum*, что может быть использовано для таргетной терапии онихомикозов с использованием ФДВ, в случаях, когда данный вид является основным возбудителем инфекции.

Список литературы:

[1] Leung A., Lam J., Leong K., Hon K., Barankin B., Leung A.,Wong A. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13, P. 32-45, (2020).
[2] Wu X., Hu Y. *Dove Medical Press*, 15, P. 3251-3266, (2022).
[3] Wang X., Peng J., Meng C., Feng F. *Chem. Sci.*, 15, P. 12234–12257, (2024).

Исследование устойчивости к тяжелым металлам у почвенных бактерий *Pseudomonas* spp.

Николаев Р.В. [2]***, Чубукова О. В.*** [1,2] ***, Хакимова Л. Р.*** [1,2,3]***,Лавина А.М.***[1]***,***
Аюпова Р.Г [2]***, Вершинина З. Р.*** [1,2]

[1]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа.
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», кафедра «Школа молекулярных технологий», Уфа.
[3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа.
chubukova@bk.ru

Ключевые слова: псевдомонады, тяжелые металлы, гены устойчивости

В результате интенсивной антропогенной деятельности в почве накапливается высокое количество загрязняющих веществ, одними из которых являются тяжелые металлы. Хотя некоторые из тяжелых металлов необходимы в следовых количествах для различных метаболических процессов в клетке, но в высоких концентрациях они становятся токсичными и представляют опасность для живых организмов (Pande et al., 2022). К распространенным тяжелым металлам, которые были обнаружены на загрязненных участках, относятся свинец (Pb), хром (Cr), мышьяк (As), цинк (Zn), кадмий (Cd), медь (Cu), ртуть (Hg) и никель (Ni) (Remenár et al., 2018). При длительном селективном воздействии ТМ на бактерии в загрязненной почве, почвенный микробиом вынужден реагировать на изменения окружающей среды путем отбора бактерий, содержащих генетические детерминаты, обеспечивающих им устойчивость к ТМ. (Raklami A., et al., 2022). Эти бактерии выработали несколько механизмов, которые регулируют накопление ионов металлов внутри клетки и к ним относятся системы выведения катионов тяжелых металлов через эффлюксные насосы, представляющие собой различные трансмембранные белковые комплексы. У бактерий различные гены устойчивости, расположенные в хромосомной ДНК в транспозонах или в плазмидах, кодируют множество типов систем эффлюксных насосов. В литературе одним из наиболее хорошо охарактеризованных оперонов, придающим устойчивость к кобальту-цинку-кадмию у грамотрицательных бактерий, является оперон *czc,* состоящий из генов czcC, czcB и czcA (Liu et al., 2021).

Поиск почвенных штаммов псевдомонад, обладающих устойчивостью к ТМ, представляет значительный интерес из-за их возможности применения в целях биоремедиации. Целью работы было анализ устойчивости к ТМ и распространения гена устойчивости *czcA* у почвенных штаммов псевдомонад из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН.

Был проведен поиск гена *czcA*, кодирующего устойчивость к тяжелым металлам, с помощью ПЦР с использованием вырожденных праймеров czcAF/czcAR (I) и 2155/3117R (II), ранее разработанных Karelova с соавторами (Karelová et al., 2011). ПЦР с применением обеих пар праймеров показала наличие гена *czcA* у штаммов *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, GOR 4.17, 4HM, и 26GL, а также у типового штамма *Pseudomonas chlororaphis* B-9444^{T}, полученного из Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (С.-Петербург). ПЦР с праймерами 2155/3117R выявило присутствие гена *czcA* у штамма *Pseudomonas* sp. 17 HM, а с праймерами czcAF/czcAR - у штамма *Pseudomonas* sp. 10 HM. Сравнительный анализ исследованных фрагментов гена *czcA,* с соответствующими генами из базы данных NCBI показал их гомологию с нуклеотидными последовательностями штаммов *Pseudomonas fluorescence* ATCC 13525^{T}, *Pseudomonas veroni G2, Pseudomonas coleopterorum* DJ13, *Pseudomonas pergaminensi* 1008^{T}, *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 17414^{T}.

Штамм *Pseudomonas* sp.	МИК, мМ			
	Cd	Ni	Pb	Zn
4 НМ	1	9	6	2
10 НМ	1	5	2	1
ОВА 2.4.1.	2	4	6	2
GOR4.17	1	3	6	2
17 НМ	1.5	8	6	2
9444	2	6	5	2
26 Gl	1	7	4	2

Табл. 1 Минимальные ингибирующие концентрации тяжелых металлов исследованных штаммов бактерий.

Культивирование штаммов *Pseudomonas* sp, у которых был идентифицирован ген *czcA,* на питательных средах с ТМ продемонстрировало, что часть исследуемых бактерий характеризуются повышенным уровнем устойчивости к цинку и кадмию, а также все штаммы обладают заметно более высоким уровнем устойчивости к никелю и свинцу (табл.1). В дальнейшем для наиболее полной оценки биоремедиационного потенциала предполагается провести поиск других детерминант устойчивости к ТМ в исследованных штаммах псевдомонад.

Список литературы:

Feng Z., Gao H., Ding L., et al. Temporal shifts in the phosphate mobilising bacterial community reveal contrasting succession patterns in response to different phosphorus sources. Environ Res. 2025;266:120599. doi: 10.1016/j.envres.2024.120599.

Pande V., Pandey S.C., Sati D., Bhatt P., Samant M. Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystemю. Front. Microbiol. 202; 13:824084.https://doi: 10.3389/fmicb.2022.824084.

Remenár M, Kamlárová A, Harichová J, Zámocký M, Ferianc P. The Heavy-Metal Resistance Determinant of Newly Isolated Bacterium from a Nickel-Contaminated Soil in Southwest Slovakia. Pol J Microbiol. 2018;67:191. doi: 10.21307/pjm-2018-022.

Raklami A, Oufdou K, Tahiri AI, Mateos-Naranjo E, Navarro-Torre S, Rodríguez-Llorente ID, Meddich A, Redondo-Gómez S, Pajuelo E. Safe cultivation of *Medicago sativa* in metal-polluted soils from semi-arid regions assisted by heat-and metallo-resistant PGPR. Microorganisms. 2019; 7: 212. https://doi: 10.3390/microorganisms7070212

Liu H, Zhang Y, Wang Y, Xie X, Shi Q. The Connection between Czc and Cad Systems Involved in Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida*. Int. J. Mol. Sci. 2021;22:9697. doi: 10.3390/ijms22189697.

Karelová, E., Harichová, J., Stojnev, T., Pangallo, D., & Ferianc, P. The isolation of heavy-metal resistant culturable bacteria and resistance determinants from a heavy-metal-contaminated site. Biologia. 2011; 66: 18. https://doi.org/10.2478/s11756-010-0145-0.

Разнообразие Т4-родственных колифагов со сниженной частотой трансдукции в сточных водах г. Пущино

Никулина А.Н.*, Зимин А.А., Сузина Н. Е., Никулин Н.А.

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

Ключевые слова: Т4-родственые колифаги, фаговая терапия, трансдукция

Вирулентные бактериофаги считаются безопасными агентами для фаговой терапии, поскольку из-за особенностей жизненного цикла они могут реже участвовать в горизонтальном переносе генов (ГПГ) путем трансдукции (Pirnay и др. 2015). Однако, некоторые из вирулентных бактериофагов, относящихся к Т4-родственным, могут осуществлять генерализованную трансдукцию плазмид с высокой частотой (Tanyashin и др. 2003). Мы предположили, что вовлеченность Т4-родственных фагов в ГПГ путем трансдукции зависит от наличия у них: неканонических оснований в составе ДНК и генов, регулирующих их метаболизм, а также генов эндонуклеаз, гидролизующих цитозиновую ДНК бактерий-хозяев (Nikulina и др. 2025). Наличие всех перечисленных факторов снижает вероятность трансдукции у Т4-родственных фагов, наоборот, отсутствие генов эндонуклеаз повышает частоту трансдукции в десятки раз. Ранее проведенный биоиформатический анализ геномов Т4-родственных бактериофагов в БД genbank показал, что Т4-родственные колифаги из подсемейства *Tevenvirinae*, а именно из родов *Tequatrovirus, Mosigvirus, Dhakavirus, Karamvirus, Gapriverviruss, Kagamiyamavirus* можно отнести к фагам со сниженной частотой трансдукции, а фаги из родов *Krischvirus, Pseudotevenvirus* – к фагам с высокой частотой трансдукции (Nikulina и др. 2025). Для фаговой терапии будут более предпочтительны колифаги из семейства *Tevenvirinae.*

Нами были разработаны ПЦР-тесты к генам гидроксиметилцитозинтрансферазы (*hmc*) и эндонуклеазы IV (*denB*), ключевым генам, наличие которых свидетельствует о том, что трансдукционные процессы могут редко осуществляться фагом. Были отобраны несколько проб из сточных вод г. Пущино, из которых было выделено более 150 изолятов колифагов на трех штаммах *E.coli.* Была охарактеризована коллекция колифагов, полученных на штамме E.coli 5KRI в виде 61 изолята. Данный штамм использовался для отбора преимущественно колифагов с неканоническими основаниями или модификациями ДНК, защищающими от систем рестрикции-модификации хозяина. На основе ПЦР-тестирования было определено, что 47 из 61 фагов принадлежат к Т4-родственным. Был проведен тест на принадлежность к Т4-родственным фагам с низкой частотой трансдукции. Результат: 46 из 47 фагов относятся к фагам с низкой частотой трансдукции. Были проведены тесты на наличие генов *hmc* фагов родов *Tequatrovirus*, *Mosigvirus*, *Dhakavirus, Karamvirus* .Большая часть фагов имеет *hmc,* относящийся к *Mosigvirus* (34 изолята), второе место занимают фаги рода *Tequatrovirus* (7 изолятов), 4 изолята относятся к фагам подсемейства *Tevenvirinae*, однако их родовую принадлежность не удалось идентифицировать. Большая часть изолятов была получена из пробы, отобранной на входе в сточные воды, по 4 изолята из активного ила и возвратного активного ила. Доминирование фагов *Mosigvirus* в коллекции может быть объяснено выбором штамма-хозяина. Таким образом, удалось отобрать 46 колифагов различных видов, имеющих большой потенциал для фаговой терапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-64-00017, https://rscf.ru/project/24-64-00017/ и за за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00205, https://rscf.ru/project/24-26-00205/ .

Список литературы:

1. Nikulina, Alexandra N., Nikita A. Nikulin, Natalia E. Suzina, и Andrei A. Zimin. 2025. «Treatment of E. Coli Infections with T4-Related Bacteriophages Belonging to Class Caudoviricetes: Selecting Phage on the Basis of Their Generalized Transduction Capability». *Viruses* 17(5): 701. doi:10.3390/v17050701.
2. Pirnay, Jean-Paul, Bob G. Blasdel, Laurent Bretaudeau, Angus Buckling, Nina Chanishvili, Jason R. Clark, Sofia Corte-Real, и др. 2015. «Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products». *Pharmaceutical Research* 32(7): 2173–79. doi:10.1007/s11095-014-1617-7.

3. Tanyashin, V. I., A. A. Zimin, M. G. Shlyapnikov, и A. M. Boronin. 2003. «Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with PseudoT-Even Bacteriophages». *Russian Journal of Genetics* 39(7): 761–72. doi:10.1023/A:1024748903232.

Влияние мутации F728A в мембранном сегменте M6 на структурно-функциональную организацию H^+-АТФазы плазматической мембраны дрожжей

Петров В.В.

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

Ключевые слова: дрожжи, плазматическая мембрана, секреторные везикулы, PMA1 H^+-АТФаза, мембранные сегменты, тепловой шок.

PMA1 H^+-АТФаза плазматических мембран – ключевой фермент метаболизма дрожжей и грибов – важных объектов пищевой промышленности, биотехнологии и медицины. Этот фермент относится к P2-АТФазам, включающим также H^+, K^+,Na^+-, H^+,K^+-, Ca^{2+}-АТФазы растений и животных. Для изучения взаимосвязи структуры и функции дрожжевой PMA1 H^+-АТФазы использовали сайт-направленный мутагенез для замены аминокислотных остатков в трансмембранном сегменте M6 (^{721}LIVFIAIFADVATLAIAYD) и последующей экспрессии ферментов, несущих замены, в секреторных везикулах (СВ). В работе использовались штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* SY4 при экспрессии замен в СВ и NY13 – при экспрессии в плазматических мембранах (ПМ). Штамм SY4 содержал хромосомную (*PMA1*) и плазмидную (*pma1*) копии гена, кодирующего PMA1 H^+-АТФазу: хромосомная копия гена АТФазы дикого типа находилась под контролем промотора *GAL1*, а плазмидная копия (дикого или мутантного типа) – под контролем промотора *HSE*, индуцируемым тепловым шоком. Штамм SY4 также содержал температурно-чувствительную мутацию в гене *SEC6*, которая блокировала слияние СВ с ПМ во время теплового шока и приводила к накоплению СВ. В штамме NY13 ген *PMA1* находился под контролем промотора *PMA1* и был связан с селективным маркером *URA3* [1, 2]. Из штамма SY4 выделяли СВ, из штамма NY13 – ПМ; везикулы и мембраны использовали для определения экспрессии фермента и его активности.

При экспрессии мутантов в СВ десять из девятнадцати замен на Ala/Ser оказались неактивными, хотя в 8 случаях (L721A, I722A, F724A, I725A, I727A, F728A, L734A, Y738A) экспрессия была на существенном уровне; только в случае D730A и D739A отсутствие активности сопровождалось блоком в экспрессии (рис. 1). Поскольку экспрессия неактивных мутантных ферментов происходила в условиях теплового шока, что могло влиять на биогенез фермента, мы решили избежать использования теплового шока и экспрессировать мутантные АТФазы в ПМ при нормальной температуре. Тем не менее, из десяти мутантов сегмента M6, утративших активность, только мутант F728A экспрессировался в ПМ и был способен поддерживать рост; остальные девять оставались летальными, что указывает на особую важность этих остатков M6 для правильного функционирования и/или структуры фермента. Что касается мутанта F728A, его ростовые характеристики, экспрессия и, в меньшей степени, АТФазная активность были близки к таковым дикого типа [3].

PMA1 H^+-АТФаза плазматической мембраны дрожжей значительно активируется, когда клетка метаболизирует глюкозу. Однако в некоторых случаях внесенные мутации нарушали механизмы активации [4]. Поэтому мы решили изучить влияние мутации F728A на регуляцию PMA1 H^+-АТФазы глюкозой. Экспрессия ферментов дикого типа и мутантного в ПМ была практически одинакова и не зависела от инкубации с глюкозой (табл. 1). Поскольку АТФаза, ассоциированная с СВ, имеет другой оптимум pH по сравнению с ферментом, связанным с ПМ, активность АТФазы измеряли при pH 5.70 (оптимум для СВ) и pH 6.25 (оптимум для ПМ) при 30°C и 37°C.

При 30°C в условиях голодания базовая активность ферментов дикого типа и мутантного была одинакова при одном и том же pH (5.70 или 6.25), при этом базовая активность у дикого типа и F728A была ниже на ~40% при pH 6.25 по сравнению с pH 5.70 (табл. 1). При сбраживании глюкозы АТФаза дикого типа показала значительную трехкратную активацию при pH 5.70 (табл. 1); при pH 6.25 активность АТФазы и уровень активации были в 6 раз выше. В случае F728A активность была ниже таковой у дикого типа на 30% (pH 5.70) или 40% (pH 6.25); сама же активность мутанта при этих pH была одинакова.

При 37°С базовые активности штаммов при pH 6.25 были на 35% (дикий тип) или 25% (F728A) ниже, чем при pH 5.70. При pH 5.70 базовая активность дикого типа превышала таковую мутанта на 15%. При этом базовая активность дикого и мутантного штамма при pH 6.25 была одинакова. При сбраживании глюкозы активность у дикого типа возрастала в 2 раза при pH 5.70 и почти в 4 раза при pH 6.25. У F728A глюкозо-зависимая стимуляция наблюдалась в 1.5 (pH 5.70) или 2 раза (pH 6.25). При этом сама активность при этих pH была одинакова. Эти данные указывали на частичное нарушение механизмов активации/регуляции мутантного фермента.

Табл. 1. Влияние мутации F728A на активность АТФазы в голодающих (-) и сбраживающих глюкозу (+) клетках *S. cerevisiae* при 30°С и 37°С. К – коэффициент активации

Штамм	Экспрессия, %		АТФазная активность, Е/мг белка					
			pH 5.70			pH 6.25		
	-	+	-	+	К	-	+	К
30°С								
Дикий тип	100	99	3.28	9.54	2.9	1.95	11.32	5.8
F728A	105	101	3.20	6.68	2.1	2.06	6.80	3.3
37°С								
Дикий тип	100	99	8.22	15.70	1.9	5.28	19.62	3.7
F728A	105	101	7.14	10.59	1.5	5.36	11.00	2.0

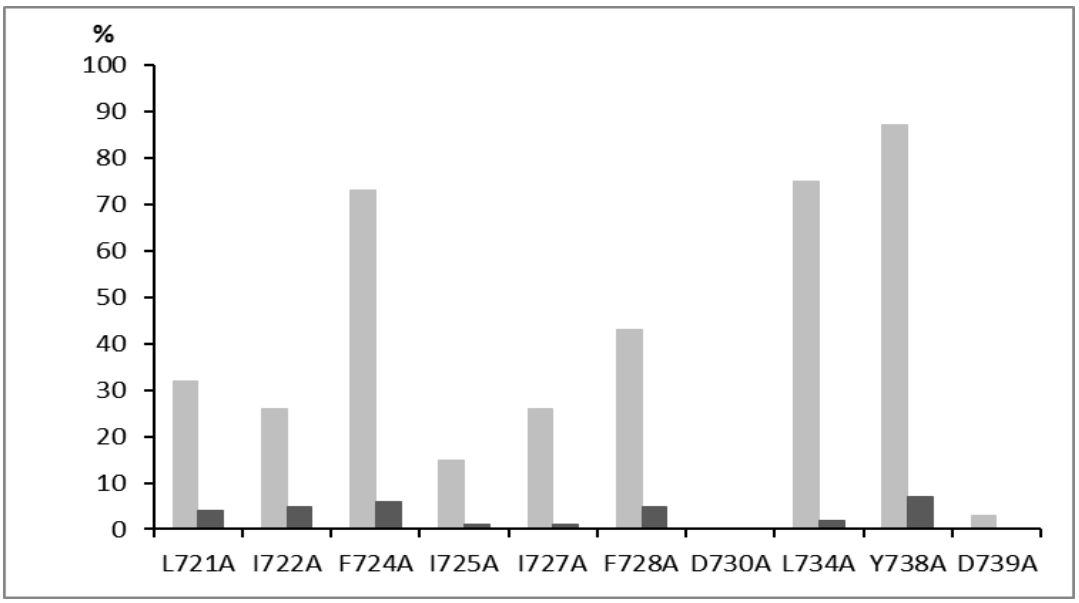


Рис. 1. Влияние Ala замен аминокислотных остатков в сегменте М6 на экспрессию (светлые колонки) и АТФазную активность (темные колонки) в % от дикого типа.

Таким образом, следует подчеркнуть важность самого сегмента М6 для структурно-функциональной организации PMA1 H^+-АТФазы и, особенно, 9 аминокислотных остатков, замены которых приводили к потере активности и/или к блокированию экспрессии в СВ и ПМ. Более того, из 9 активных в СВ мутантов у 6 наблюдались отклонения в кинетике гидролиза АТФ и/или сопряжении его с H^+-транспортом [5]. Иными словами, из 19 аминокислотных остатков в М6 замены только трех не оказывали особого влияния на структурно-функциональную организацию PMA1 АТФазы. Что касается Phe-728, этот остаток, вероятно, важен для нормального взаимодействия доменов фермента между собой и/или с другими белками и/или с липидным микроокружением, а тепловой шок вызывал нарушение этих взаимодействий, о чем косвенно свидетельствует температурная «активация» фермента. Все эти факторы приводили к исчезновению активности АТФазы при экспрессии мутанта F728A в секреторных везикулах при тепловом шоке, но сохранению ее функционирования при экспрессии в плазматических мембранах при обычной температуре.

Список литературы:

1. *Guerra G., Petrov V. V., Allen K. E., Miranda M., Pardo J. P., and Slayman C. W*. Role of transmembrane segment M8 in the biogenesis and function of yeast plasma-membrane H^+-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 2383-2392.
2. *Петров В. В*. Точечные мутации в Pma1 H^+-АТРазе дрожжей *Saccharomyces cerevisia*e: влияние на ее экспрессию и активность // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1070-1080.
3. Петров *В.В*. Значение мембранных сегментов М6 и М8 в биогенезе и функционировании PMA1 H^+-АТРазы дрожжей // *Микробиология*. 2025. Т. 94. С. 163-178.
4. *Петров В.В*. Влияние мутаций в экстрацитозольном домене H^+-АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisia*e на ее активность и регуляцию // *Микробиология*. 2023. Т. 92. С. 329-334.
5. *Miranda M., Pardo J. P., Petrov V. V*. Structure-function relationships in membrane segment 6 of the yeast plasma membrane Pma1 H^+-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. P. 1781-1789.

Получение двухдоменной лакказы актинобактерии *Streptomyces carpinensis*в клетках *Rhodococcus qingshengii* X5

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

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

Ключевые слова: двухдоменная лакказа, *Rhodococcus qingshengii*, штамм-продуцент

Рекомбинантные технологии и гетерологичные экспрессионные системы позволяют получать чистый препарат белка гораздо быстрее, нежели чем при использовании классических подходов к очистке, но очень часто такие белковые препараты оказываются неактивны. Решением этой проблемы становится использование организмов, филогенетически менее удаленных от источника целевого гена, в качестве систем гетерологичной экспрессии. Так, для получения некоторых секретируемых белков микобактерий (класс *Actinomycetales*, порядок *Mycobacteriales*) используют клетки *Streptomyces lividans* (класс *Actinomycetales*, порядок *Streptomycetales*), которые распознают нативные сигнальные последовательности и экспортируют их во внеклеточную среду.

Целью нашей работы мы поставили получить двухдоменную лакказу ScaSL (номер в базе данных NCBI: WP_086728190.1) штамма *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300 (класс *Actinomycetales*, порядок *Streptomycetales*) в секретируемой форме в клетках штамма *Rhodococcus qingshengii* X5 (класс *Actinomycetales*, порядок *Mycobacteriales*), чтобы показать принципиальную возможность использования родококков для экспрессии белков стрептомицетов. В качестве гетерологичной системы экспрессии были выбраны клетки *Rhodococcus qingshengii* X5, потому что они (1) растут быстро (2 суток на богатой питательной среде), (2) непритязательны к составу питательных сред, (3) поддаются генетической модификации, что позволяет влиять на выход и чистоту рекомбинантного белка, (4) совместимы с хорошо изученными микобактериальными промоторами. Для достижения вышеозначенной цели нам необходимо было: (1) модифицировать рекомбинантную плазмиду pMyCA, содержащую ацетамидный промотор, таким образом, чтобы к N-концу белка не добавлялась последовательность из 6ти гистидинов, (2) клонировать в модифицированной плазмиде ген двухдоменнойлакказы (WP_086728190.1) штамма *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300 с собственным сигнальным пептидом на N-конце, (3) определить наличие в культуральной жидкости лакказной активности по завершению культивирования модифицированного родококка.

Клетки *Rhodococcus qingshengii* X5, трансформированные pMyCA(2d_laccase_ ScaSL), уже через сутки культивирования накапливали рекомбинантный белок в культуральной жидкости, что мы фиксировали, используя экспресс-тест на лакказную активность. Для этого вносили культуральную жидкость в буферный раствор, содержащий универсальный лакказый субстрат – АБТС в концентрации 0,2 мМ. По изменению цвета реакционной смеси судили о наличии лакказной активности. Однако значительную часть активности мы обнаружили в биомассе, которую ранее отделили от культуральной жидкости. Следует отметить, что биомасса клеток кишечной палочки *E.coli* M15(pREP4), содержащая в цитоплазме функционально активную двухдоменную лакказу ScaSL, не проявляет активности в отношении АБТС, а значит лакказа, которую мы получали в штамме *Rhodococcus qingshengii* X5, может быть локализована на поверхности клеток родококка. Одним из ключевых этапов культивирования стало добавление ионов меди в концентрации 0,5 мМ в питательную среду: только в этом случае мы фиксировали активность белка в культуральной жидкости, в то время как в отсутствии ионов меди активность обнаруживалась только в собранной биомассе клеток.

Итак, двухдоменную лакказу *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ac-1300, содержащую нативный сигнальный пептид, удалось получить в секретируемой форме в клетках *Rhodococcus qingshengii* X5 в присутствии ионов меди в среде культивирования. И то, что часть функционально активного белка была локализована на поверхности клетки, позволяет планировать эксперименты по модификации клеточной поверхности клеток родококка для увеличения выхода рекомбинантного белка.

Влияние вторичной координационной сферы железа на функциональные свойства катехол 1,2-диоксигеназы

Ренфельд Ж.В.[1], Фролов И.В.[2], Черных А.М.[1], Горина С.Ю.[1], Коломыцева М.П.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
mkolomytseva@rambler.ru
[2]Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

Ключевые слова: катехол 1,2-диоксигеназа, сайт направленный мутагенез, координационная сфера железа, реакционная способность.

Катехол 1,2-диоксигеназа – железосодержащий фермент, катализирующий интрадиольное расщепление ароматического кольца катехола и его производных между двумя смежными гидроксильными группами. Реакция протекает с включением молекулярного кислорода и приводит к образованию *цис,цис*-муконовой кислоты или её производных (Рис. 1).

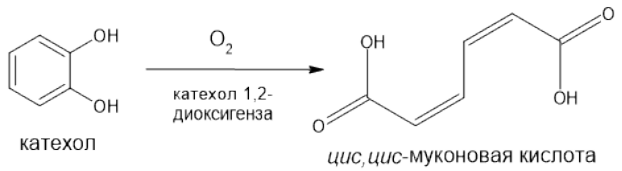


Рис. 1. Реакция расщепления катехола катехол 1,2-диоскигеназой.

Катехол 1,2-диоксигеназы перспективны для биоремедиации ароматических ксенобиотиков, количество которых в окружающей среде постоянно растёт вследствие антропогенной деятельности. Кроме того, эти ферменты могут быть использованы для создания биосенсоров и для биосинтеза *цис,цис*-муконовой кислоты – ценного предшественника в синтезе ряда промышленно важных соединений (Zucolotto et al., 2006; Di Nardo et al., 2009; Matthiesen et al., 2016). Таким образом, углублённое изучение катехол 1,2-диоксигеназ представляет значительный фундаментальный и прикладной интерес. Несмотря на многолетние исследования их структуры и функций, молекулярные механизмы, определяющие субстратную специфичность этих ферментов, остаются изученными недостаточно полно.

Ранее нами было показано, что катехол- и 3-хлоркатехол-1,2-диоксигеназы из бактерии *Rhodococcus opacus*, несмотря на идентичный аминокислотный состав внутренней поверхности в полости активного центра, демонстрируют различную субстратную специфичность по отношению к метилзамещённым катехолам (Matera et al., 2010). Более детальный анализ показал, что вторичная координационная сфера атома железа в активном центре этих ферментов содержит аминокислотные замены. В связи с чем, целью настоящего исследования было изучение влияния точечных аминокислотных замен именно во вторичной координационной сфере железа катехол 1,2-диоксигеназы *R. opacus* на функциональные свойства фермента.

Методами сайт-направленного мутагенеза на основе созданного ранее экспрессионного вектора, содержащего нативный ген катехол 1,2-диоксигеназы из *R. opacus* с His-тегом, были получены его мутантные формы с одиночными и множественными аминокислотными заменами. Проведённые исследования показали, что введение таких замен оказывает существенное влияние на субстратную специфичность фермента в отношении замещённых катехолов, его спектральные характеристики, а также на значения pH- и температурного оптимума фермента. Таким образом, полученные данные подтверждают ключевую роль вторичной координационной сферы железа в модуляции реакционной способности катехол 1,2-диоксигеназы. Результаты работы открывают перспективы для направленного дизайна ферментов этого класса с целью получения биокатализаторов с заданными свойствами.

Список литературы:

Zucolotto V, Pinto APA, Tumolo T, Moraes ML, Baptista MS, Riul A, Araújo APU, Oliveira ON. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1, 2-dioxygenase. Biosensors and Bioelectronics. 2006 21(7):1320-1326.

Di Nardo G, Roggero C, Campolongo S, Valetti F, Trottac F, Gilardi G. Catalytic properties of catechol 1, 2-dioxygenase from Acinetobacter radioresistens S13 immobilized on nanosponges. Dalton Transactions. 2009 33:6507-6512.

Matthiesen JE, Carraher JM, Vasiliu M, Dixon DA, Tessonnier J-P. Electrochemical conversion of muconic acid to biobased diacid monomers. ACS Sustainable Chem. Eng. 2016 4(6):3575–3585.

Matera I, Ferraroni M, Kolomytseva M, Golovleva L, Scozzafava A, Briganti F. Catechol 1,2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts. J Struct Biol. 2010 170(3):548-564.

Особенности метаболизма мутантного штамма *Methylotuvimicrobium alcaliphilum* 20Z-G с инактивированной глюкокиназой

Розова О.Н., Бут С.Ю., Шавкунов К.С., Мельников О.И., Шустова М.Н., Хмеленина В.Н., Мустахимов И.И.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», ИБФМ РАН
mii80@rambler.ru

Ключевые слова: *Methylotuvimicrobium alcaliphilum,* метанотрофы, гликоген, глюкокиназа, глюкоза

Methylotuvimicrobium alcaliphilum 20Z, являясь облигатным метанотрофом, не способен к росту на полиуглеродных субстратах, в том числе глюкозе. Однако делеционный мутантный штамм *M. alcaliphilum* 20Z-G с инактивированной глюкокиназой, демонстрировал пониженную скорость роста и не накапливал гликоген (Mustakhimov et al., 2017). В данной работе нами был проведен анализ дифференциальной экспрессии, показавший значимое изменение уровня экспрессии 557 генов (log2 ≥0,7 и ≤-0,07, padj ≤ 0,01) в штамме 20Z-G по сравнению с диким типом. Одними из генов, отреагировавших наибольшим увеличением уровня мРНК, были гены альтернативного, хотя и менее эффективного вследствие высокого значения Км для глюкозы (92 мМ) ключевого фермента, пути утилизации свободной глюкозы: глюкозо-1-дегидрогеназы, глюконаткиназы и глюконолактоназы. Данный путь ведёт к образованию 6-фосфоглюконата, что объясняет повышение уровня мРНК фосфоглюконатдегидрогеназы, катализирующей образование рибулозо-5-фосфата (Р5Ф) – акцептора формальдегида. Избыток Р5Ф, видимо, спровоцировал увеличение экспрессии гексулозофосфатизомеразы (ГФИ), транскетолазы и фосфокетолазы. Ген гексулозофосфатсинтазы не изменил уровня экспрессии, указывая на наличие дополнительного промотора для транскрипции гена *phi.* Вероятно, активность ГФИ является одним из узких мест ассимиляции ФА у *M. alcaliphilum* 20Z. Обнаружен повышенный уровень мРНК энергодающих реакций гликолиза – глицеральдегиддегидрогеназы и пирукаткиназы, а также ряда реакций цикла Кребса. Кроме того, увеличился уровень мРНК ферментов, предположительно участвующих в процессе деградации гликогена, а именно: амилазы А1, ген которой расположен среди генов синтеза и деградации гликогена, амилазы А2, чей ген расположен в непосредственной близости от гена глюконаткиназы, и мальтоолигозилтрегалазы. Вероятно, увеличение активности данных ферментов привело к резкому снижению уровня гликогена в мутантном штамме.

В лимите по азоту метанотрофы, в том числе и *M. alcaliphilum* 20Z, активно накапливают гликоген, тогда как в штамме 20Z-G сильного увеличение уровня гликогена не детектировано (57 против 456 мг/г ВСБ в диком типе). Однако в штамме 20Z-G обнаружен высокий уровень внутриклеточной глюкозы, составивший 3,7 мг/г ВСБ, тогда как в диком штамме данное значение составило 0,8 мг/г ВСБ. Данный факт также указывает на увеличение процесса деградации гликогена, сопровождаемое увеличением концентрации глюкозы.

У *M. alcaliphilum* 20Z имеется два гена *zwf1* и *zwf2*, кодирующих НАДФ- и НАД-зависимые глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, соответственно. Ген *zwf1* расположен в 27 нуклеотидах от гена *gnd*, кодирующего 6-фосфоглюконатдегидрогеназу и уровень мРНК которого повысился в штамме 20Z-G. Методом обратной транскрипции, нами показано, что оба гена находятся в одном опероне, однако отсутствие увеличения экспрессии второго гена может указывать на наличие терминатора трансляции после гена *gnd.* Продукт гена *zwf2* НАД-зависимая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является очень нестабильным ферментом и имеет высокое значение Км (34 мМ) для глюкозо-6-фосфата. Возможно, снижение экспрессии данного гена, связано с отсутствием необходимого количества субстрата.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 25-24-00496.

Растворение и минерализация фосфата цинка гопеита грибами

Сазанова К.В.[1,2], Родина О.А. [1], Сеник С.В. [1], Корнеев А.В. [3,4], Зеленская М.С.[3]

[1]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
[2]Санкт-Петербургский филиал Архива РАН
[3]Санкт-Петербургский государственный университет
[4]ООО «ЭКРОСХИМ», Санкт-Петербург
barinova-kv@mail.ru

Ключевые слова: микробная биоминерализация, *Aspergillus niger*; *Penicillium chrysogenum,* цинк, гопеит, биоремедиация.

Гомеостаз фосфора является неотъемлемой частью метаболизма грибов и важным посредником в их взаимоотношениях с другими организмами. Способность грибов растворять труднорастворимые фосфаты и повышать биодоступность Р используется растениями, образующими микоризу [1]. Данных об образовании фосфатов под влиянием грибов крайне мало [2-5], хотя очевидно, что этот процесс гораздо масштабнее, чем известно в настоящее время. Фосфат цинка гопеит $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ является одним из наиболее устойчивых фосфатов цинка, который может образовываться при участии грибов. Гопеит имеет низкую растворимость (Ksp = 10-35,5), что указывает на его потенциал для биологической очистки сточных вод от органических загрязнителей и цинка. С другой стороны, доступность Р в почвах, как правило, низкая. Большинство почв испытывают дефицит доступного Р и не могут обеспечивать потребности растений в фосфоре без удобрения. Гопеит в сельскохозяйственных почвах может влиять на минеральное питание растений, функционируя как медленно растворимый резервуар Р и Zn.

Целью данного исследования было выявление закономерностей минерализации и растворения гопеита почвенными грибами, а также изучение влияния гопеита как источника фосфора на рост и метаболизм грибов.

Для исследования были выбраны два штамма грибов *Aspergillus niger* (Ch4/07 (номер в Генбанке KF768341) и *Penicillium chrysogenum*) Cs/21 (номер в Генбанке OP758843). Грибы культивировали на жидкой питательной среде Чапека–Докса с различным содержанием источника фосфора и цинка в среде.

В первой серии опытов в стандартную среду Чапека-Докса (г/л: глюкоза—30; $NaNO_3$-2.0; KH_2PO_4-1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0.5; KCl-0.5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$-0.01) добавляли $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в следующих концентрациях: 250 мкмоль, 500 мкмоль, 1000 мкмоль и 2000 мкмоль.

Во второй серии опытов химически синтезированный гопеит добавляли в среду в концентрации 5000 мкмоль. В качестве контроля грибы выращивали на среде, не содержащей источник фосфора и стандартной среде Чапека (содержащей гидрофосфат калия).

В ходе эксперимента количество биомассы мицелия контролировали гравиметрическим методом, измеряли pH культуральной жидкости. Состав низкомолекулярных органических соединений в мицелии и в культуральной жидкости гриба определяли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС). Мицелий экстранировали смесью метанол:хлороформ:вода (5:2:2). Экстракты культуральную жидкость выпаривали до сухого остатка, растворяли в пиридине (50 мкл) и дериватизировали BSTFA (50 мкл). Пробы анализировали на приборе Maestro с масс-селективным детектором Agilent 5975.

Фазовый состав продуктов кристаллизации определяли методом рентгеновской дифракции (РФА). Дополнительно использовали световую и сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) с контролем химического состава методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

В первой серии опытов в питательной среде Чапека–Докса (без инокуляции спор грибов) сразу после автоклавирования при концентрации Zn 250–500 мкмоль в среде выпадали одиночные игольчатые кристаллы гопеита $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (идентифицировано методом РФА), размером до 500 мкм, часто объединенные в пластинки или сростки. Концентрацию свободного Zn в среде после химического осаждения гопеита определяли рентгенофлуоресцентным методом.

Анализ концентрации свободного цинка в растворах показал, что 64–85% общего содержания Zn остается в растворе в форме свободного (биодоступного) Zn, тогда как только 15–36% общего содержания Zn связано в нерастворимом фосфате.

Рост и метаболизм грибов *A. niger* и *P. chrysogenum* существенно зависели от концентрации Zn в среде в среде. Биодоступный Zn в концентрациях 192–432 мкмоль (при общей концентрации Zn 250–500 мкмоль Zn) выступал в роли физиологически необходимого элемента, активируя рост мицелия гриба. При увеличении концентраций до 639–1626 мкмоль (1000–2000 мкмоль общего Zn) Zn оказывал токсическое действие и подавлял рост гриба. В этом эксперименте в культуральной жидкости обоих видов грибов фосфор находился в избытке и сохранялся в среде на протяжении всего эксперимента. Соответственно, грибы не испытывали фосфорного голодания.

В культуре *A. niger*, обильно продуцирующего щавелевую и лимонную кислоты, pH снижалось до 2, в единственном случае, при концентрации Zn 2000 мкмоль среда была менее кислой (pH 5–6). В отличие от *A. niger*, под действием *P. chrysogenum* происходило защелачивание среды (pH 7 - 9). Кислотность культуральной жидкости существенно влияло на взаимосвязанные процессы растворения и кристаллизации гопеита, происходящие под действием гриба. В кислой среде, под действием *A. niger* кристаллы фосфата цинка интенсивно растворяются и происходит образование оксалата цинка катсаросита (рис. 1). В слабокислой или нейтральной среде рядом с быстро растворяющимися кристаллами абиогенного гопеита видны мелкие кристаллы биогенного гопеита, которые формируют трубчатые структуры вокруг гиф гриба (рис. 2). В щелочной среде культуральной жидкости *P. chrysogenum* абиогенный гопеит практически нерастворим, но образование биогенного гопеита происходит более интенсивно (рис. 3), чем в культуре *A. niger*.

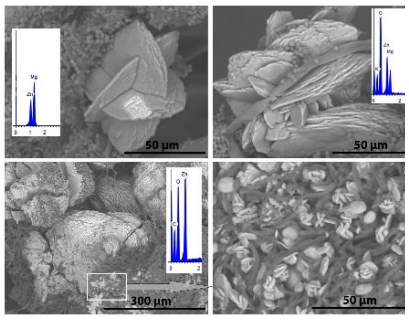


Рис. 1. Оксалат цинка катсаросит в культуре *A. niger*.

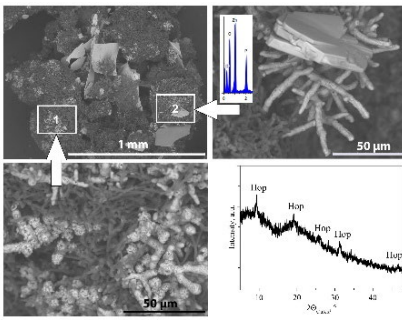


Рис. 2. Абиогенный и биогенный гопеит в культуре *A. niger*.

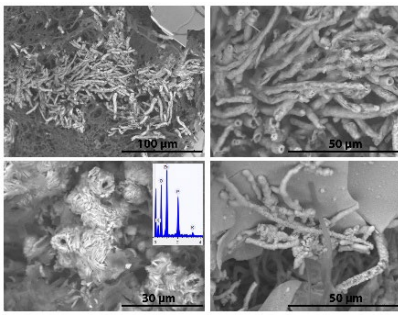


Рис. 3. Абиогенный и биогенный гопеит в культуре *P. chrysogenum*.

Во второй серии опытов, в условиях дефицита фосфора (на бесфосфорной среде) рост мицелия *A. niger* был в 5-8 раз медленнее, чем в контроле. На среде с гопеитом мицелий, напротив рос быстрее и количество накопленной на 10-е сутки биомассы в 1,2-1,6 раз превышало количество биомассы в контроле, что, возможно, связано с эффектом цинка, высвобождающегося в результате растворения гопеита. *A. niger* активно растворял гопеит за счет выделения в среду органических кислот. Наиболее выраженные метаболомные различия были характерны для культур, выращенных на бесфосфорной среде, по сравнению с культурами, выращенными на средах с гопеитом и KH_2PO_4.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 25-14-00490).

Список литературы:

1. Bhalla K, Qu X, Kretschmer M, Kronstad J. The phosphate language of fungi. *Trends Microbiol.* 2022, *30*, 338–349.
2. Ennever J, Summers F. Calcification by Candida albicans. *J. Bacteriol.* 1975, *122*, 1391–1393.
3. Rhee Y, Hillier S, Gadd G.M. Lead Transformation to Pyromorphite by Fungi. *Curr. Biol.* 2012, *22*, 237–241.
4. Xu X, Hao R, Xu H, Lu A. Removal mechanism of Pb(II) by Penicillium polonicum: Immobilization, adsorption, and bioaccumulation. *Sci. Rep.* 2020, *10*, 9079.
5. Liang X, Hillier S, Pendlowski H. Uranium phosphate biomineralization by fungi. *Environ. Microbiol.* 2015, *17*, 2064–2075.

Биохимическая характеристика оксидоредуктаз аминофосфонатов почвенных бактерий рода *Achromobacter*

Свиридов А.В.[1], Эпиктетов Д.О.[1], Шушкова Т.В.[1], Тарлачков С.В.[1,2], Леонтьевский А.А.[1]

[1] ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
avsviridov@pbcras.ru
[2] Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ключевые слова: органофосфонаты, фосфонатаза, оксидаза, диоксигеназа, 2-аминоэтилфосфоновая кислота, 1-гидрокси-2-аминоэтилфосфонат

По современным данным, значительную роль в биологическом круговороте фосфора играют органофосфонаты (ОФ) – соединения, содержащие прямую ковалентную связь углерод-фосфор (C–P^{3+}). Среди биогенных ОФ наиболее распространена 2-аминоэтилфосфоновая кислота (2-АЭФ). Катаболизм 2-АЭФ с высвобождением ортофосфата считается одной из важнейших стадий редокс-цикла фосфора, протекающего в мировом океане [1]. Данный процесс может протекать по двум путям: гидролазному и диоксигеназному. В первом случае задействованы трансаминаза PhnW и фосфоноацетальдегидгидролаза PhnX (фосфонатаза), во втором – железосодержащие диоксигеназы PhnY и PhnZ. Фосфонатазный путь считался весьма древним и консервативным, однако работы последних лет выявили у различных таксонов бактерий варианты данного пути, включающие флавиновые оксидазы, аммоний-лиазу и гомологи диоксигеназы PhnZ [2]. Ранее, мы показали, что фосфонатазные генные кластеры почвенных штаммов-деструкторов ОФ *Achromobacter insolitus* Kg 19 и *A. aegrifaciens* Kg 16 включают в себя гены гипотетических флавиновых оксидаз *hpnW* и диоксигеназ *phnHD*. Указанные белки были выделены в рекомбинантной форме, для HpnW подтверждено наличие нековалентно связанного ФАД в качестве кофактора, отработаны методы измерения активности новых ферментов. Показано, что HpnW выполнял функцию трансаминазы PhnW, осуществляя окислительное деаминирование 2-АЭФ с образованием субстрата фосфонатазы и перекиси водорода. Для PhnHD была разработана ферментативная методика синтеза предполагаемого субстрата – *R*-1-гидрокси-2-аминоэтилфосфоната (*R*-ГАЭФ) и показана способность новой диоксигеназы отщеплять от него ортофосфат с образованием глицина.

Целью дальнейшей работы стала биохимическая характеристика новых ферментов ОФ ахромобактеров в сравнении с описанными в литературе ОФ-оксидоредуктазами иных таксонов бактерий.

Кривые насыщения HpnW *A. insolitus* Kg 19 и *A. aegrifaciens* Kg 16 при использовании 2-АЭФ в качестве субстрата отвечали кинетике Михаэлиса как при прямом измерении активности по выделению перекиси водорода, так и при измерении в двойной сопряженной реакции с фосфонатазой и алькогольдегидрогеназой по убыли НАДН. Для определения кинетических параметров HpnW использовали данные прямого измерения, линеаризованные в координатах Хайнса-Вулфа.

Оба варианта HpnW отличались сравнительно невысокой максимальной скоростью реакции (Табл. 1), но за счет низкого значения константы Михаэлиса обладали хорошей каталитической эффективностью (k_{cat}/K_m), превосходя по этому параметру ассоциированные с фосфонатазным путем оксидоредуктазы PbfB, PbfC, PbfD за исключением специализированной 2-АЭФ-оксидазы PbfD2 *Mariniblastus fucicola*

Табл. 1. Кинетические характеристики HpnW ахромобактеров в сравнении с новыми оксидоредуктазами ОФ при использовании 2-АЭФ в качестве субстрата

Фермент	K_m, мМ	V_{max}, ФЕ/мг белка	k_{cat}, $с^{-1}$	k_{cat}/K_m, л $моль^{-1}$ $с^{-1}$
PbfD1 *Acinetobacter baumanni**	71,0±16	н/о**	9,10±1,7	128,0±6
PbfD2 *Mariniblastus fucicola**	2,60±0,32	н/о**	8,90±0,3	3423,0±320
PbfC *Azospirillum sp.* B510*	20,0±1,7	н/о**	2,20±0,1	110,0±6
HpnW *A. insolitus* Kg 19	**1,56±0,09**	**0,70±0,05**	**0,47±0,04**	**300,0±20**
HpnW *A. aegrifaceins* Kg 16	**1,53±0,11**	**0,67±0,07**	**0,47±0,04**	**298,0±24**

* литературные данные [3]

** не определяли

Ингибиторами HpnW служил ряд ионов металлов и *пара*-хлормеркурийбензоат (Табл. 2). Также слабыми конкурентными ингибиторами выступали глифосат и аминометилфосфонат, что соответствует ранее полученным данным о возможном связывании данных соединений активным центром HpnW в качестве лигандов.

Табл. 2 – IC_{50} ингибиторов HpnW, мМ

Фермент	ГФ	АМФК	*п*-ХМБ	Ag^+	Cu^{2+}	Co^{2+}
HpnW *A. insolitus* Kg 19	14,8±0,2	12,3±0,5	0,7±0,1	1,8±0,1	2,4±0,2	2,8±0,3
HpnW *A. aegrifaciens* Kg 16	13,9±0,4	12,1±0,4	0,6±0,3	1,9±0,4	2,2±0,2	2,8±0,2

Кинетические кривые PhnHD получали, определяя накопление ортофосфата в реакционных смесях с *R*-ГАЭФ по цветной реакции с молибдатом аммония на основании калибровочной кривой. Вычисленные значения Km были схожи с таковыми для HpnW, однако весьма низкая скорость реакции определяла малую каталитическую эффективность PhnHD при окислении *R*-ГАЭФ и указывала на то, что предпочтительным субстратом данных диоксигеназ может быть иной ОФ.

Табл. 3. Кинетические характеристики PhnHD ахромобактеров при использовании *R*-ГАЭФ в качестве субстрата

Фермент	K_m, мМ	V_{max}, ФЕ/мг белка	k_{cat}/K_m, л $моль^{-1}$ $с^{-1}$
PhnHD *A. insolitus* Kg 19	2,60±0,3	0,010±0,003	1,0±0,09
PhnHD *A. aegrifaceins* Kg 16	2,50±0,2	0,009±0,001	1,0±0,04

Список литературы:

1. *Murphy A.R.J., Scanlan D.J., Chen Y., Adams N.B.P., Cadman W.A., Bottrill A., Bending G., Hammond J.P., Hitchcock A., Wellington E.M.H., Lidbury I.D.E.A.* Transporter characterisation reveals aminoethylphosphonate mineralisation as a key step in the marine phosphorus redox cycle // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 4554. DOI: 10.1038/s41467-021-24646-z
2. *Ruffolo F., Dinhof T., Murray L., Zangelmi E., Chin J.P., Pallitsch K., Peracchi A.* The microbial degradation of natural and anthropogenic phosphonates // Molecules. 2023. V. 28. P. 6863. DOI: 10.3390/molecules28196863
3. *Zangelmi E., Ruffolo F., Dinhof T., Gerdol M., Malatesta M., Chin J.P., Rivetti C., Secchi A., Pallitsch K., Peracchi A.* Deciphering the role of recurrent FAD-dependent enzymes in bacterial phosphonate catabolism // iScience. 2023. V. 26. P. 108108. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108108.

Изменение содержания внутриклеточного цистеина у бактерий *Escherichia coli* при осмотическом стрессе

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

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН» – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Пермь
lyubov-sutormina@mail.ru

Ключевые слова: бактерии *Escherichia coli*, осмотический стресс, внутриклеточный цистеин.

Метаболизм низкомолекулярных тиолов в клетках прокариот играет существенную роль в поддержании редокс-баланса при воздействии различных стрессовых факторов. Цистеин, являясь компонентом белков и глутатиона, принимает важное участие в жизненно важных процессах клеток, включая регуляцию активности ферментов, клеточную сигнализацию и антиоксидантную защиту (Смирнова и др., 2001). Для бактерий *Escherichia coli*, цистеин выполняет критическую роль в защите от стрессов окружающей среды, включая осмотический шок. Также известно, что в процессе развития осмотического шока у бактерий *E. coli* присутствуют явления, специфические для окислительного стресса (Smirnova et al., 2000). В нормальных условиях концентрация цистеина поддерживается в клетках на низком уровне, однако, в критических условиях его гомеостаз может значительно изменяться (Imlay et al., 2015). На основании этого представляет интерес изучить изменения содержания цистеина в клетках *E. coli* при осмотическом стрессе.

Цель данной работы – исследование изменений уровня внутриклеточного цистеина у *E. coli* в условиях осмотического шока. Культуру *E. coli* BW25113 (родитель, дикий тип) и полученного на его основе мутанта JW2663 (Δ*gshA*), лишенного глутатиона, выращивали на минимальной среде М9 с 0.2% глюкозой в термостатируемом шейкере при 37 ℃. Осмотический шок индуцировали добавлением в культуру 0.6 М NaCl в середине логарифмической фазы роста. Определение цистеина проводили по методу Gaitonde (Gaitonde, 1967).

Исходные скорости роста исследуемых штаммов составляли 0.62 ± 0.02 $ч^{-1}$ и 0.71 ± 0.03 $ч^{-1}$ для BW25113 и JW2663 соответственно. При индукции осмотического шока наблюдали резкое снижение скорости роста до отрицательных значений у обоих штаммов, после чего культура постепенно возобновляла рост. Адаптация в условиях повышенной осмолярности протекала быстрее у родительского штамма – через 90 минут инкубации скорость роста восстановилась на 53% от исходного значения, а у *gsh*-мутанта – на 36%.

Концентрация внутриклеточного цистеина в контрольных условиях была в 1.5 раза выше у штамма BW25113 по сравнению с *gshA*-мутантом JW2663 и составляла 0.098±0.007 и 0.065±0.005 $\mu M/OD_{600}$ соответственно. Добавление в среду 0.6 М NaCl вызывало повышение уровня цистеина у обоих штаммов. Через 30 минут после индукции осмотического шока содержание внутриклеточного цистеина увеличилось в 1.8 и 2.3 раза для BW25113 и JW2663 соответственно. Спустя 2 часа инкубации у родительского штамма наблюдали постепенное снижение концентрации цистеина практически до исходных значений, однако, у *gshA*-мутанта этот показатель оставался повышенным относительно контрольных условий.

Таким образом, осмотический стресс сопровождается нарушением гомеостаза цистеина в клетках *E. coli.* Способность к восстановлению цистеинового гомеостаза снижается у мутанта, лишенного глутатиона, и, по-видимому, играет важную роль в процессе адаптации к осмотическому стрессу.

Исследование выполнено в рамках гос. задания № 124020500028-4.

Список литературы:

1. Смирнова Г. В., Красных Т. А., Октябрьский О. Н. Роль глутатиона при ответе *Escherichia coli* на осмотический шок // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1195–1201.
2. Smirnova G. V., Muzyka N. G., Oktyabrsky O. N. The role of antioxidant enzymes in response of *Escherichia coli* to osmotic upshift // FEMS Microbiology Letters. 2000. Vol. 186. P. 209–213.
3. Imlay KRC. [et al.] The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of Escherichia coli // J. Bacteriol. – 2015. – V. 197. – P. 3629–3644.
4. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // Biochem. – 1967. – V. 104. – P. 627–633.

Активность и субстратная специфичность кислой фосфатазы Pho3p целых клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Томашевский А.А.

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

Ключевые слова: PHO3, полифосфаты, дрожжи, кислая фосфатаза, *Saccharomyces cerevisiae*

Pho3p – кислая фосфатаза дрожжей, локализованная в клеточной стенке *S.cerevisiae*. Её основной субстрат – тиаминфосфаты. Присутствие в клеточной стенке дрожжей неорганических полифосфатов означает наличие ферментов, которые осуществляли бы их синтез и деградацию. Целью работы было выяснить, способна ли кислая фосфатазы Pho3p целый клеток к гидролизу других фосфорсодержащих субстратов, в том числе неорганических полифосфатов.

В работе использовали штаммы дрожжей BY4742 (родительский штамм) и производный от него нокаут-штамм по гену *PHO3*. Целые клетки, выращенные до стационарной стадии роста на полноценной среде, обладают фосфатазной активностью не только с классическим искусственным субстратом p-нитрофенилфосфатом (PNPP), но и с пирофосфатом, АТФ, неорганическими полифосфатами (полиР) и глицерофосфатом. В супернатанте после осаждения клеток из реакционной смеси активность не зафиксирована, что говорит о том, что фермент, отвечающий за наблюдаемую активность, не секретируется в среду. pH оптимум находится в диапазоне 3.8-4.0, что соответствует таковому кислых фосфатаз Pho3p и Pho5p. Однако Pho5p синтезируется при фосфорном голодании и не способна гидролизовать полифосфаты, как это известно из литературных данных.

Табл. 1. Фосфогидролазные активности целых клеток *S. cerevisiae* при pH 4.0 и концентрации субстратов 2.5 мМ, мкмоль Р/мин г сырой биомассы

Субстрат	Штамм BY4742	Штамм *Δpho3*
ПолиР15	1.139 ±0.08	0.133 ±0.02
Пирофосфат	0.752 ±0.08	0.182 ±0.01
PNPP	1.079 ±0.12	0.109 ±0.02
АТФ	0.818 ±0.09	0.182 ±0.02
Глицерофосфат	0.853 ±0.12	0.133 ±0.02

Значения константы Михаэлиса для p-нитрофенилфосфата, пирофосфата, АТФ, и полиР составили 1.78, 0.83, 0.64 и 0.38 мМ соответственно.

У штамма с делецией гена *PHO3* такая активность в 10 раз меньше, чем у родительского штамма, что доказывает принадлежность наблюдаемой активности ферменту Pho3. Таким образом кислая фосфатазы Pho3p измеряемая с использованием целых клеток, имеет широкую субстратную и способна гидролизовать неорганические полифосфаты.

Роль дополнительного шаперонина GroEL при колонизации растений метилотрофом *Methylobacterium oryzae* CBMB20

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

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

Ключевые слова: аэробные метилотрофные бактерии, множественные шаперонины GroEL, фитостимулирующие бактерии.

Ранее мы обнаружили, что метилотрофный фитосимбионт *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T обладает двумя бицистронными опероннами генов, кодирующих белки теплового шока GroES1/GroEL1 и GroES3/GroEL3 (локусы MOC_0690-0691 и MOC_4714-4715, соответственно) (Torgonskaya et al., 2024). Белки GroES и GroEL необходимы для правильного сворачивания и рефолдинга многих клеточных белков, в том числе в условиях стресса, и у большинства организмов они кодируются одним опероном *groESL*. Однако в геномах ряда микроорганизмов (ризобии и другие протеобактерии, цианобактерии, актинобактерии, *Firmicutes*) гены *groES* и *groEL* представлены множественными паралогами, отличающимися друг от друга (Kumar et al., 2015). Показано, что у некоторых клубеньковых ризобий и азотфиксирующих β-протеобактерий множественные шаперонины GroES и GroEL несут специализированные функции, в том числе в стресс-ответе и регуляции симбиотических взаимодействий этих микроорганизмов с растениями (Kumar et al., 2015). Для исследования ролей отдельных шаперонинов GroEL у *M. oryzae* CBMB20^T ранее нам удалось методом сайт-специфичной гомологичной рекомбинации сконструировать нокаут-мутант CBMB20 Δ*groEL3* (по гену MOC_4715). При этом штамм с нарушенным геном *groEL1* (MOC_0690) так и не был получен, по-видимому, из-за более значимой роли шаперонина GroEL1 в обеспечении жизнеспособности клеток *M. oryzae* CBMB20^T. Учитывая, что *M. oryzae* CBMB20^T обладает хорошо описанной способностью стимулировать рост растений (Kwak et al., 2014), целью данной работы была оценка влияния на нее инактивации гена дополнительного шаперонина GroEL3 (GenBank AIQ92470.1).

Сравнительную оценку фитостимулирующей активности исходного и мутантного штаммов проводили путем анализа характеристик колонизированных ими растений салата (*Lactuca sativa* L.), выращенного в течение 3 нед в вегетационных опытах. Контролируемыми параметрами роста были длина и масса побегов и корней, а также удельная плотность листьев (УПЛ), тесно связанная со скоростью роста и фотосинтетической активностью (Ivanova et al., 2018). Для характеристики функционирования фотосинтетического аппарата растений определяли также содержание хлорофиллов (*a* и *b*) и каротиноидов. В результате, растения, инокулированные исходным штаммом CBMB20, продемонстрировали существенные различия с контрольными (неинокулированными) растениями по всем показателям, кроме содержания хлорофилла *b*. Они характеризовались большей длиной и массой корней и побегов (на 20–24% и 13–15%, соответственно), их настоящие листья были субъективно крупнее и имели более насыщенную тёмно-зелёную окраску, а значения УПЛ на четверть превышали таковые контрольных растений. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в них также было в 1.6–1.7 раза выше, нежели в неинокулированном контроле. Напротив, растения, инокулированные мутантом CBMB20 Δ*groEL3*, достоверно отличались от контрольных растений лишь по длине корней и побегов (на 18% и 11%, соответственно). Таким образом, обработка растений бактериями с инактивированным геном шаперонина GroEL3 приводила к существенно меньшему увеличению их продуктивности по сравнению с инокуляцией исходным штаммом *M. oryzae* CBMB20.

Проведенный нами ранее фенотипический анализ мутанта CBMB20 Δ*groEL3* показал, что одной из причин такого снижения его способности стимулировать рост и развитие растений может быть уменьшение продукции этим штаммом индолпроизводных (в 1.4 раза), действующих на растения как фитогормоны, активирующие рост, корнеобразование и формирование их проводящих тканей. Кроме того, способность мутанта растворять фосфаты также оказалась снижена по сравнению со штаммом дикого типа. Так максимальная концентрация растворимых форм фосфора в культуральной жидкости штамма CBMB20 Δ*groEL3* при росте на среде с $Ca_3(PO_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора была на 20% меньше таковой для CBMB20 и достигалась на трое

суток позже. Тем не менее, наблюдаемый эффект был обусловлен не только снижением этих полезных для растений характеристик у мутантного штамма. Еще одной, но весьма существенной причиной оказалось уменьшение его способности колонизировать растения, выявленное при сравнительном анализе устойчивости ассоциации исследуемых штаммов с растениями-хозяевами. Так, если с двухнедельными листьями колонизированных ростков салата было ассоциировано одинаковое количество бактерий штаммов CBMB20 и CBMB20 Δ*groEL3*, то через 3 недели роста растений численность клеток мутанта уже была вдвое ниже таковой штамма дикого типа. Последнее, вероятно, является следствием замедленного роста (на более чем 12 ч) мутанта CBMB20 Δ*groEL3* на метаноле – основном C_1-субстрате, выделяемом растениями.

Таким образом, добавочный шаперонин GroEL3 (GenBank AIQ92470.1) действительно оказывает существенное влияние на взаимодействие *M. oryzae* CBMB20 с растениями и его ростостимулирующие свойства, однако опосредованно, через процессы, важные для жизнедеятельности самих бактерий. Способствуя росту на C_1-соединениях, природными источниками которых являются растения, он повышает эффективность колонизации последних, а также солюбилизации метаболитами нерастворимых фосфатов в почве, улучшая питание и бактериальных, и растительных клеток. В то же время более активная в присутствии шаперонина GroEL3 продукция индолпроизводных, участвующих в регуляции метаболизма и стресс-ответа бактерий (Fahad et al., 2015), не только повышает их устойчивость к неблагоприятным факторам, но и оказывает стимулирующее влияние на рост тканей растения-хозяина.

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

Список литературы:

Torgonskaya M.L., Firsova Y.E., Ekimova G.A., Agafonova N.V. Distribution and potential ecophysiological roles of multiple GroEL chaperonins in pink-pigmented facultative methylotrophs // Microbiology (Moscow). 2024. V. 93(1). P. 14-27.

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.

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.

Ivanova L.A., Zolotareva N.V., Ronzhina D.A., Podgaevskaya E.N., Migalina S.V., Ivanov L.A. Leaf functional traits of abundant species predict productivity in three temperate herbaceous communities along an environmental gradient // Flora. 2018. V. 239. P. 11–19.

Fahad S., Hussain S., Bano A., Saud S., Hassan S., Shan D. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. P. 4907–4921.

Получение и характеристика мутантов *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 по генам LD-транспептидаз

Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.

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

Ключевые слова: аэробные метилотрофные бактерии, дихлорметан, LD-транспептидазы

Ранее сравнительный анализ протеомов клеток метилотрофного деструктора *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 при росте на дихлорметане (CH_2Cl_2, ДХМ) и метаноле выявил повышенное накопление белков, кодируемых генами METDI3291 и METDI0480, в присутствии галометана (Muller et al., 2011). Указанные гены, предположительно, кодируют LD-транспептидазы (LDT), участвующие в создании поперечных сшивок 3-3-типа в пептидогликане, упрочняющих конструкцию клеточной стенки и повышающих устойчивость к воздействию растворителей. При этом кодируемые ими белки CAX24940.1 и CAX22139.1 различаются по аминокислотным последовательностям (уровень сходства 43%) и доменной структуре.

Поиск других гомологов LDT в геноме *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4, проведенный с помощью алгоритма BLAST на основании сходства с аминокислотными последовательностями белков CAX24940.1, CAX22139.1, а также шести известных LDT (LdtA-LdtF) *Escherichia coli* BW25113 (GenBank: CP009273.1), выявил присутствие 22 генов-паралогов. На основе филогенетического анализа транслированных аминокислотных последовательностей, проведенного с помощью программы MEGA X, обнаружено, что 14 из них, включая оба исследуемых нами белка, проявляют сходство с LdtA *E. coli*, а еще по 4 последовательности близки LdtD или LdtF *E. coli*. При этом аминокислотная последовательность, кодируемая геном METDI0480, образует отдельную ветвь в пределах своей группы и является единственной, содержащей наряду с каталитическим доменом YkuD домен связывания с пептидогликаном PGRP.

Нами была поставлена задача изучить роль белков CAX24940.1 и CAX22139.1 в адаптации к росту на ДХМ путем получения и характеристики нокаут-мутантов по соответствующим генам. Для этого на основе мобилизуемого суицидного вектора pK18mob (Km^R) (Schäfer et al., 1994) нами были сконструированы плазмиды, несущие мутантные варианты генов METDI3291 и METDI0480, разорванные вставкой гена устойчивости к гентамицину. Полученные конструкции посредством штамма *E. coli* S17-1 переносили в клетки *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 путем двуродительского скрещивания и из полученных трансконъюгантов отбирали только двойные рекомбинанты, устойчивые к гентамицину и чувствительные к канамицину. Для конструирования двойного мутанта использовали систему *cre-lox*, позволяющую повторно использовать маркеры антибиотикоустойчивости (Marx, Lidstrom, 2001). В результате нами были получены нокаут-мутанты *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 по генам METDI3291 и METDI0480 (Δ*ldt*3291 и Δ*ldt*0480), а также двойной мутант по указанным генам (Δ*ldt*3291Δ*ldt*0480).

Фенотипический анализ не выявил различий в динамике роста на метаноле между мутантами и исходным штаммом, однако скорость роста двойного мутанта Δ*ldt*3291Δ*ldt*0480 на ДХМ оказалась снижена более чем в два раза ($\mu=0.021\pm0.001$) по сравнению со штаммом дикого типа ($\mu=0.047\pm0.003$). При этом инактивация гена лишь одной из двух исследуемых LDT приводила только к незначительному отставанию (~5%) в росте на ДХМ. Поскольку нарушение функционирования LDT может оказывать влияние на прочность клеточной стенки бактерий, методом серийных разведений нами была оценена выживаемость клеток исследуемых штаммов в условиях осмотического стресса, обусловленного присутствием в среде 0.1-0.15M NaCl или 0.3M сахарозы. Однако при росте на метаноле значимых различий для исходного и мутантных штаммов не было обнаружено. Это может быть следствием как относительно низкой экспрессии LDT CAX24940.1 и CAX22139.1 при росте на метаноле, так и специализации их функций для адаптации к воздействию растворителей типа ДХМ.

Известно, что LD-транспептидазы инактивируются антибиотиками класса карбапенемов, ацилирующими каталитический цистеин в активных центрах этих ферментов (Mainardi et al., 2007). С использованием диско-диффузионного метода нами выявлено уменьшение чувствительности к

меропенему на среде с метанолом у мутантов (радиус зоны подавления роста составил 29.7±0.3; 28.7±0.3; 28.2±0.6 и 30.3±0.3 мм для Δ*ldt*0480, Δ*ldt*3291, Δ*ldt*3291Δ*ldt*0480 и штамма дикого типа, соответственно). Полученные результаты согласуются с данными изучения антибиотикоустойчивости аналогичных мутантов других грамотрицательных бактерий (Kathayat et al., 2025).

Итак, кодируемые генами METDI3291 и METDI0480 белки, по-видимому, являются специализированным инструментом адаптации клеточной стенки деструктора *M. dichloromethanicum* subsp. *dichloromethanicum* DM4 к деградации ДХМ, и их утрата лишь частично компенсируется другими LDT этого микроорганизма. В целом, наличие у штамма DM4, как и у близкородственных метилотрофов и ризобий, столь широкого спектра (>20) паралогичных LD-транспептидаз указывает на значительный потенциал их адаптации путем модификации структуры пептидогликанового слоя. Интересно также, что гены идентичных или близких белков (100 и 99% сходства с CAX24940.1 и CAX22139.1, соответственно) присутствуют в геноме родственного штамма *Methylobacterium dichloromethanicum* subsp. *chloromethanicum* CM4, не способного расти на ДХМ, но использующего природный галометан – хлорметан.

Список литературы:

Muller E.E., Hourcade E., Louhichi-Jelail Y., Hammann P., Vuilleumier S., Bringel F. Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens* DM4 // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. No 9. P. 2518-2535.

Schäfer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler 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.

Marx C.J., Lidstrom M.E. Broad-host-range *cre-lox* system for antibiotic marker recycling in Gram-negative Bacteria // BioTechniques. 2002. V. 33. P. 1062-1067.

Mainardi J.L., Hugonnet J. E., Rusconi F., Fourgeaud M., Dubost L., Moumi A. N., Delfosse V., Mayer C., Gutmann L., Rice L.B., Arthur M. Unexpected inhibition of peptidoglycan LD-transpeptidase from *Enterococcus faecium* by the β-lactam imipenem // J Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 30414–30422.

Kathayat D., Huang Y., Denis J., Rudoy D., Schwarz H., Szlechter J. LD-transpeptidase-mediated cell envelope remodeling enables developmental transitions and survival in *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila* // J Bacteriol. 2025. V. 207(2):e0024724. doi: 10.1128/jb.00247-24.

Изучение микробного десульфонирования таурина почвенными актинобактериями

Цой А.В., Белецкая А.В., Бойко М.И., Дёмин К.А.

ЮФУ «Южный Федеральный Университет» (Академия биологии и медицины им. Д.И. Ивановского), Ростов-на-Дону
anastat@sfedu.ru

Ключевые слова: цикл серы, органосульфонаты, таурин, сульфит, почва.

Органосульфонаты (ОС) — это класс органических соединений с общей формулой $R{-}SO_3^{2-}$ (Hales et al., 1982). Микроорганизмы могут использовать углеродный скелет ОС в качестве источника углерода и энергии для роста, а также выделять сульфонатную часть в виде свободного сульфита и окислять его до сульфата (Cook, 1998). Один из наиболее распространенных ОС, таурин (2-аминоэтансульфонат), под действием тауриндиоксигеназы (TauD) метаболизируется до аминоацетальдегида и сульфита (O'Brien, 2006). Микробный метаболизм ОС хорошо изучен на ограниченном наборе модельных культур, тогда как экологическая значимость деструкции ОС до сих пор неясна.

Актуальность: несмотря на известность общих путей биодеградации таурина, динамика накопления и повторного использования промежуточных метаболитов, в частности сульфита, изучена недостаточно.

Цель: определить динамику накопления сульфит-ионов в культуральной жидкости ряда почвенных актинобактерий на среде с таурином в качестве единственного источника углерода.

Объектом исследования являлись 9 штаммов актинобактерий, выделенные из различных почв Ростовской области. Биомасса штаммов использовалась для инокуляции жидкой питательной среды, содержащей минеральную основу и таурин в качестве единственного источника углерода (2 г/л). На 5-е и 17-е сутки отбирались аликвоты культуральной жидкости и замораживались для дальнейшего йодометрического окислительно-восстановительного титрования с целью определения концентрации сернистой кислоты. Ряд изолятов секвенировали с использованием технологии Oxford Nanopore.

Результаты: у актиномицетов Г4Н, Г4Н2, Т2Н2 и Т5 наблюдалось понижение концентрации сульфита в течение 17 суток. Концентрация свободной сернистой кислоты в культуральной жидкости у штамма Г4Н на 5-е сутки составила 21,5±2,9 мг/л, а на 17-е сутки 53,4±9,8 мг/л. В накопительной культуре Г4Н2 концентрация сульфита в среде на 5-е сутки составила 15,6±0,7 мг/л, а на 17-е сутки 15,3±0,6 мг/л. На 5-е сутки концентрация сульфита у Т2Н2 составила 16,4±1,6 мг/л, на 17-е сутки составила 15,5±0,6 мг/л. А у изолята Т5 концентрация сульфита равнялась 16,1±1 мг/л на 5-е сутки и 14,4±0,3 мг/л на 17-е сутки. У актиномицета М2Н2 наблюдалось повышение концентрации сульфита на 5–17 сутки. Накопительная культура М2Н2 содержала 12,7±1,5 мг/л сульфита на 5-е сутки, а на 17-е сутки 15,9±1,3 мг/л.

У немицелиальных актинобактерий М2Н и Н2Н2 наблюдалось понижение концентрации сульфита на 5–17 сутки. У М2Н содержание свободной сернистой кислоты в среде составило на 5-й день 13,9±1,1 мг/л, на 17-й день 13,1±1,2 мг/л. Н2Н2 накопил сернистую кислоту на 5-й день 14,7±0,8 мг/л, на 17-й день 13,1±1,2 мг/л. У немицелиального штамма Н3Н2 наблюдалось повышение концентрации сульфита на 5–17 сутки. Концентрация сульфита на 5-й день составила 15,4±0,8 мг/л, а на 17-й день 17,8±1 мг/л.

По результатам проведения теста Манна-Уитни у штаммов Т5, Н2Н2, Г4Н статистически значима разница в содержании свободной сернистой кислоты на 5-е и 17-е сутки инкубации (*p value* <0,001).

Для части культур были отсеквенированы геномы и определено таксономическое положение. Штамм Т5 принадлежит к виду *Streptomyces anulatus*, штамм Н2Н2 – *Arthrobacter siccitolerans*, а изолят М2Н – *Rhodococcus gordoniae*, Т2Н2 – *Streptomyces tauricus*, Г4Н2 – *Streptomyces aurantiacus.* В геномах данных бактерий обнаружены гены таурин-диоксигеназы *TauD*, алкансульфонат-монооксигеназы *SsuDE* и сульфитоксидаз *SorA* и *SUOX*.

Таким образом, изученные почвенные актинобактерии активно десульфонируют таурин и потенциально окисляют образующийся сульфит в сульфат с получением энергии.

Список литературы:

1. Hales S. G. et al. Initial stages in the biodegradation of the surfactant sodium dodecyltriethoxy sulfate by Pseudomonas sp. strain DES1 //Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – Т. 44. – №. 4. – С. 790-800.

2. Cook A. M., Laue H., Junker F. Microbial desulfonation //FEMS Microbiology Reviews. – 1998. – V. 22. – №. 5. – P. 399-419.

3. О'Брайен Дж. Р. Биохимическое исследование ферментов, участвующих в метаболизме таурина. – 2006.

Оценка формирования резистентности золотистого стафилококка к фиолетовому светодиодному (405 нм) излучению в ходе антимикробной фотодинамической терапии

Шарабарина Т.В., Каневский М.В., Тучина Е.С.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов
tanuha290902@gmail.com

Ключевые слова: антимикробная фотодинамическая терапия, фиолетовое излучение, 405 нм, *Staphylococcus aureus* 209, каротиноиды, спектр пропускания, H_2O_2.

Развитие антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) как перспективного метода лечения инфекционных заболеваний привело к комплексному изучению внутриклеточных эффектов в ответ на воздействие. В то же время, ряд авторов показали, что бактерии способны приобретать толерантность к возникновению АФДТ после 10–15 циклов облучения [1,2].

Целью данной работы является изучение влияния усиления фотодинамического действия фиолетового (405 нм) светодиодного излучения на репликацию клеток *Staphylococcus aureus* 209 P при многократном использовании. Источником излучения служил светодиод с максимальной интенсивностью излучения $\lambda = 405 \pm 15$ нм, мощностью излучения 70 мВт/см^2.

За один (1) цикл облучения принимали однократное облучение бактериальной суспензии в течение 15 мин. Контрольные (необлученные) и облученные бактериальные суспензии высевали на поверхность плотной среды. Через 24 часа подсчитывали количество выросших колоний (КОЕ). При 0 (контроль), 15 и 30 циклах облучения определяли экспериментальную устойчивость культуры к действию H_2O_2 в минимальной ингибирующей концентрации. Для спектрофотометрического исследования каротиноидного состава пигментов клеток *S. aureus* 209 P культуры выращивали на среде Петрович в течение 3–5 суток при температуре 37 °C, затем собирали и экстрагировали смесью этилацетата и 1,7 М водного раствора NaCl (1:1). Для оценки спектров пропускания полученных экстрактов проводили спектрофотометрический анализ с использованием оптоволоконных зондов USB4000-UV-VIS (Ocean Optics, США) и QR400-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США) в диапазоне длин волн 345–800 нм в кювете толщиной 1 мм.

Было показано, что численность *S. aureus* 209 P снижалась при повторном облучении. С 1-го по 10-й цикл количество КОЕ *S. aureus* 209 P снижалось на 15% - 18%, с 10-го по 15-й цикл снижение количества клеток становилось более выраженным - на 18 - 33%, затем, с 15-го по 20-й цикл численность восстанавливалась (снижение КОЕ относительно контроля на 28%), с 20-го по 30-й цикл показатели выживаемости после облучения оставались на прежнем уровне (снижение КОЕ относительно контроля на 20%).

Поскольку в клетках в ходе фотореакций I типа под действием радиации образуется перекись водорода [3], была оценена способность бактериальных клеток адаптироваться к этому соединению как к фактору окислительного стресса. Установлено, что наибольшей устойчивостью к 20 и 25 циклам облучения обладал штамм *S. aureus* 209 P, МПК H_2O_2 для которого составила 176 и 264 мкМ соответственно.

Для оценки вклада каротиноидов в нейтрализацию фотодинамического эффекта использовали: исходную (контрольную) культуру, не подвергавшуюся воздействию фиолетового (405 нм, 70 мВт/см^2) излучения, и штамм *S. aureus* 209 P 30, подвергнутый облучению в течение 30 циклов.

Установлено, что колонии штамма 30 на среде Петрович имели более выраженную золотистую окраску. Для оценки содержания каротиноидов в клетках был проведен анализ спектров пропускания экстрактов, полученных из образцов культур контрольного штамма и штамма 30 одинаковой биомассы.

Полученные спектры имели различия в пределах 10–15%. При этом значения коэффициента пропускания для штамма 30 оказались ниже, чем для контрольного штамма, что свидетельствует о большем содержании веществ в данном образце. Характерный минимум отмечен на длинах волн 450–470 нм, что соответствует максимальному поглощению стафилоксантина.

Результаты исследования показали, что к применению метода фотодинамической терапии на практике следует подходить с осторожностью, поскольку формирование толерантности к воздействию у целевого микроорганизма происходит к 15-му циклу облучения и может существенно ухудшить результаты лечения. Тем не менее, исследование может стать основой для реализации комплексного подхода к решению проблемы толерантности/резистентности микроорганизмов к воздействию оптического излучения, призванного обеспечить как эффективное уничтожение бактерий, так и отсутствие у них резистентности к методу.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №25-24-00370 от 28.12.2024 г.

Список литературы:

1. Guffey J.S., Payne W., Jones T., Martin K. Evidence of resistance development by Staphylococcus aureus to an in vitro, multiple ‧stage application of 405 nm light from a supraluminous diode array // Photomed. Laser Surg. 2013. Vol. 31. P. 179–182.
2. Paronyan M.H., Koloyan H.O., Avetisyan S.V., Aganyants H.A., Hovsepyan A.S. Study of the possible development of bacterial resistance to photodynamic inactivation // Biol. J. Armen. 2019. Vol. 71. P. 17–22.
3. Kashef N., Hamblin M.R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? // Drug Resist. Updat. 2017. Vol. 31. P. 31–42.

Получение и исследование свойств актинобактериальной лакказы из штамма *Streptomyces nodosus* ВКМ Ac-1224

Шестакова Е.К.[1], Трубицина Л.И.[2], Трубицин И.В.[2], Петракова М.П.[2], Леонтьевский А.А.[2]

[1]Пущинский филиал ФГБОУ высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», [2]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
eugeniiashestakova@mail.ru

Ключевые слова: двухдоменная лакказа, аффинная хроматография, pH-оптимум.

Двухдоменная актинобактериальная лакказа – это фермент из класса оксидоредуктаз, который играет важную роль во множестве биологических процессов: защита клеток от окислительного стресса, деградация лигнина, а также принимает участие в синтезе меланина, который защищает бактерию от УФ-излучения. Лакказы, благодаря имеющимся у них свойствам, могут активно применяться в биоремедиации, в целлюлозно-бумажной промышленности, выступать в роли биосенсоров. Особенности структуры активного центра двухдоменных делают их устойчивыми к действию ингибиторов – азидов, фторидов, хлоридов. Лакказы обладают высокой термостабильностью, что немаловажно для промышленных процессов, они функционируют и в кислых, и в щелочных условиях.

Двухдоменная лакказа, ранее детектированная в геноме бактерии *Streptomyces nodosus* ВКМ Ac-1224, обладала высокой гидрофобностью в области субстратного кармана, что могло указывать на её средний окислительно-восстановительный потенциал. Однако у неё были выявлены аминокислотные детерминанты низкого окислительно-восстановительного потенциала. Исследование свойств новой двухдоменной лакказы поможет классифицировать её по величине потенциала, а также установить, обладает ли она биотехнологическим потенциалом.

Цель работы: очистка и характеристика активной двухдоменной лакказы SnSL из штамма *Streptomyces nodosus* ВКМ Ac-1224.

Клонирование целевого гена производилась по сайтам рестрикции SacI и HindIII в плазмиду pQE30. Вектором трансформировали штамм M15 [pRep4]. Трансформантов растили при 37 °C до оптической плотности 1,0 при 590 нм, затем вносили 100 мкл 0,5 М изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и 400 мкл 0,5 М сульфата меди (II). После 16 часов инкубации при 16 °C, а затем 24 ч инкубации при 21 °C биомассу собирали и разрушали. Клеточный экстракт с рекомбинантным белком наносили на колонку с Ni-сефарозой. Элюцию лакказы проводили буфером с 500 мМ имидазолом, после чего проводили диализ белка для очистки препарата белка от солей и имидазола.

Фермент был получен в гомогенном состоянии; удельная активность фермента составила 25 Ед/мг белка. Выход лакказы с литра среды – 36 мг. Был измерен спектр поглощения лакказы, а также pH-оптимумы окисления четырёх субстратов: АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)), 2,6-диметоксифенола (2,6-ДМФ), гваякола и феруловой кислоты. Максимальная активность окисления АБТС лакказой наблюдалась при pH 2,9-3,0; 2,6-ДМФ – при pH 8,1; гваякола и феруловой кислоты – при pH 9,0.

Выводы: новая двухдоменная лакказа из штамма *Streptomyces nodosus* ВКМ Ac-1224 была очищена при помощи аффинной хроматографии и получена в гомогенном состоянии. Выход лакказы составил 36 мг с литра среды. Лакказа окисляла субстраты АБТС, 2,6-ДМФ, гваякол и феруловую кислоту с максимальной скоростью при pH 2,9-3,0; 8,1; 9,0 и 9,0, соответственно.

СЕКЦИЯ 3
Ресурсный биотехнологический потенциал микробного разнообразия

Characterization of proteolytic, thermophilic bacteria isolated from geothermal springs in Tajikistan

Sabrinai Ismatullo, Dzhuraeva M.M., Birkeland N.-K., Bobodzhanova Kh.I.

Center of Biotechnology of the Tajik National University, Dushanbe, Tajikistan
dmunavvara@bk.ru

Keywords: thermophilic bacteria, proteases, geothermal springs, biotechnology, enzymes.

Microorganisms that live in very hot environments, called thermophiles, are becoming important tools in modern industrial biotechnology. They are being used to create eco-friendly products like bioplastics, biofuels, and to help clean up pollution [1].

The geothermal hot springs of Tajikistan remain largely unexplored from a microbiological and biotechnological standpoint. Of particular interest are thermophilic microorganisms capable of producing proteolytic enzymes (proteases) [2], which are widely used in industry, biomedicine, and scientific research. Proteases derived from thermophilic bacteria possess high specific activity and remarkable chemical and thermal stability, making them promising candidates for biotechnological applications [3].

Objectives of the study - To isolate and characterize thermophilic bacterial strains with proteolytic activity from geothermal springs in Tajikistan.

Materials and Methods. A total of 24 environmental samples were collected from geothermal hot springs including Jelondy, Garmchashma, Bibi Fatima, Avj, Jayhun, and Khoja-Obi-Garm. The samples included water (6), salt deposits (9), sediments (6), algae (2), and biomass filtered via membrane filtration [4-5]. Enrichment cultures were prepared using a basal mineral medium containing (per liter): NaCl-1.0g; $MgSO_4 \times 7H_2O$-0.3g, KCl-0.3g, NH_4Cl- 0.5g; $CaCl_2 \times 2H_2O$- 0.1g, and KH_2PO_4 - 0.3g. Chicken feathers were added as the primary substrate, and cultures were incubated aerobically at 56 °C for 10 days with daily monitoring. This approach was based on earlier work describing *Fervidobacterium pennivorans* subsp. *keratinolyticus*, a novel anaerobic thermophilic feather-degrading bacterium [4-5].

All samples were analyzed using standard microbiological techniques. In total, 96 thermophilic bacterial isolates were obtained. Based on their high enzymatic activities, fourteen isolates (D2S, D3SP1, D4SP4, D5A, G6W, G10SO, BF12W, BF13WS, BF14SG, A17W, Q19, KhOG21S, KhOG22S, and KhOG23S) were selected for further physiological and biochemical characterization.

Morphological and biochemical characteristics, particularly proteolytic activity, were studied using casein-based media. Proteolytic activity was assessed by the presence of clear hydrolytic zones around colonies, indicating protein degradation.

MA (Milk Agar) tests. Assessed protease activity (casein hydrolysis). A positive result was indicated either by a clearing zone (+) or by the measured halo diameter (mm). Absence of clearing (-) denoted no detectable proteolytic activity.

Results. Out of the 96 isolates, 46 demonstrated proteolytic activity. Hydrolysis zones ranged from 3 to 22 mm in diameter. Results from four enrichment steps are summarized as follows:

- 1st enrichment: 7 isolates, hydrolytic zones 4-8 mm
- 2nd enrichment: 10 isolates, zones 6-20 mm
- 3rd enrichment: 8 isolates, zones 5-20 mm
- 4th enrichment: 21 isolates, zones 3-22 mm

Thus, 47.9% of the thermophilic isolates exhibited proteolytic activity. The highest activity was observed in isolates obtained during the fourth enrichment stage.

Conclusion. This study emphasizes the great potential of geothermal hot springs in Tajikistan as a valuable source of thermophilic bacteria that produce proteolytic enzymes useful in various industries. The isolated bacteria could be used to develop heat-stable enzymes and enzyme cocktails for applications in biotechnology, food production, and pharmaceuticals. The research shows that hot springs in the high-altitude areas of Tajikistan host diverse communities of heat-loving bacteria with promising industrial potential. However, many of these bacteria are still not well described and need further studies. The composition of microbial communities was found to be heavily influenced by local environmental

conditions, which should be taken into account in future research. By offering a culture-based analysis of bacterial diversity in Tajikistan's hot springs, this work adds to the global knowledge of microbial ecosystems and highlights these springs as a promising source of new thermostable enzymes for industrial use.

References

1. Li J., Sun L., & Huo Y.-X. High-Temperature Catalytic Platform Powered by Thermophilic Microorganisms and Thermozymes. *Synthetic Biology and Engineering, 3*(1), 2025 10001. https://doi.org/10.70322/sbe.2025.10001.
2. Bruins M.E., Janssen A.E., Boom R.M. Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents. Appl Biochem Biotechnol. 2001 Feb;90(2):155-86. doi: 10.1385/abab:90:2:155. PMID: 11297390.
3. Kambourova M. Thermostable enzymes and polysaccharides produced by thermophilic bacteria isolated from Bulgarian hot springs. Eng Life Sci. 2018 Jun 4;18(11):758-767. doi: 10.1002/elsc.201800022. PMID: 32624870; PMCID: PMC6999257.
4. Javier-Lopez R., Mandolini E., Dzhuraeva M., Bobodzhanova K., Birkeland N.-K. *Fervidobacterium pennivorans* subsp. *keratinolyticus* subsp. nov., a Novel Feather-Degrading Anaerobic Thermophile. Microorganisms. 2023; 11(1):22. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010022.
5. Сабринаи Исматулло, Джураева М.М. Характеристика бактерий горячих источников Таджикистна. Материалы Республиканской научно-практической конференции (с международным участием), посвящённой «Двадцатилетию изучения и развития естественнонаучных, точных и математических дисциплин в области науки и образования», на тему: «Механизмы адаптации организмов к изменяющимся условиям окружающей среды» (г. Душанбе, 27 февраля 2025 года). Душанбе, 2025. С. 101-104.

Вторичные метаболиты фитопатогенных грибов *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, выделенных в Краснодарском крае и Абхазии

Антипова Т.В. [1,2]***, Желифонова В.П.***[1]***, Литовка Ю.А.***[3,4]***, Баскунов Б.П.***[1]***, Носков А.Е.***[1]***, Тимофеев А.А.***[3,4]***, Павлов И.Н.***[3,4]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
tatantip@rambler.ru
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений
[3]Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
[4]Сибирский государственный университет науки и технологий им. М. Ф. Решетнева

Ключевые слова: крифонекроз, скайрины, ругулозин, фитотоксичность.

Cryphonectria parasitica (Murrill) M.E. Barr известны как грибы, вызывающие крифонекроз каштанов. Это заболевание привело к гибели деревьев во многих районах Северной Америки и Европы, вызывая повсеместную эпидемию (Rigling and Prospero, 2018). Проявление симптомов, индуцированных возбудителем на восприимчивых хозяевах, варьирует в зависимости от вирулентности конкретного штамма *C. parasitica* и возраста зараженной части дерева. Основной стратегией биоконтроля крифонекроза является искусственное распространение гиповирулетных штаммов гриба, ослабленных вирусом *Cryphonectria hypovirus,* которое приводит к снижению скорости роста гриба, женской стерильности и уровня бесполого спороношения. Уменьшение вирулентности гриба связано с заметными изменениями в морфологии колоний, такими как снижение споруляции и пигментации.

Грибы *C. parasitica* первоначально были обнаружены в Восточной Азии в Китае, Японии и Корее. В течение 20 века возбудитель был случайно завезен сначала в Северную Америку, а затем в Европу вместе с саженцами азиатских каштанов. Сведения о поражении крифонекрозом каштанов на территории РФ малочисленны. Было проведено исследование о распространении гриба на Северо-Западном Кавказе, где было обнаружено практически полная зараженность каштана благородного и выявлены лишь единичные гиповирулентные штаммы (Попов и др., 2010).

Одним из факторов вирулентности *C. parasitica* могут быть щавелевая кислота, ферменты и фитотоксины. Поликетиды скайрины, ругулозины, диапортины относятся к числу немногих вторичных метаболитов, описанных на сегодняшний день у *C. parasitica.* Было показано, что они обладают рядом интересных биологических свойств, в том числе антибактериальной, инсектицидной и цитотоксической активностями.

Цель работы – изучение вторичных метаболитов фитопатогенных грибов *C. parasitica*, выделенных из коры ослабленных деревьев *Castanea sativa* Mill, и их фитотоксичности в отношении растительных тест-объектов *in vitro*.

Объектом исследования служили 27 штаммов грибов, изолированных в чистую культуру из коры и древесины каштана посевного (*C. sativa*), пораженных крифонекрозом. Образцы были отобраны в Краснодарском крае (Сочи, Красная поляна) и Абхазии в 2022-2023 гг. Штаммы хранятся в коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). На основе морфологических и молекулярно-генетических признаков штаммы были отнесены к виду *C. parasitica.* Было проведено исследование фитопатогенности *C. parasitica* на двух растительных тест-объектах – на побегах *C. sativa* и плодах яблок сорта Granny Smith. Исследуемые штаммы *C. parasitica* проявляли различную фитопатогенность в отношении целевого и нецелевого растительных тест-объектов *in vitro.* В соответствии с фитопатогенными свойствами штаммы были сгруппированы на две условные группы.

Первая группа объединила 67 % грибных культур, у которых максимальная патогенность отмечена на плодах яблок и различная степень патогенности (включая максимальные показатели) –

на побегах *C. sativa.* Во вторую группу входят 33 % штаммов *C. parasitica*, которые проявили слабую фитопатогенность на яблоках и побегах каштана.

В настоящее время известно несколько вирусов, которые заражают *C. parasitica*. Ранее было показано, что фильтраты культуральной жидкости вирулентных и гиповирулентных штаммов по-разному способны ингибировать рост каллуса чувствительных растений *C. sativa* и устойчивых растений *C. mollissima.* Был сделан вывод, что патогенность является показателем вирулентности. Известно, что для гиповирулентных штаммов, зараженных вирусом CHV1 (*Cryphonectria hypovirus* 1), характерно образование более светлых колоний. Однако, у штаммов с низкой патогенностью отличий в морфологии мы не наблюдали, за исключением отдельных случаев выщепления более светлых участков в колонии. Таким образом, на основании нашего исследования, можно отметить, что около 70 % изученных штаммов являются вирулентными, остальные штаммы можно считать условно гиповирулентными.

По спектру синтезируемых метаболитов изученные штаммы *C. parasitica* различались. У всех штаммов обнаружены димерные антрахиноны скайрин, скайринол и ругулозин, чем и объясняется окрашивание мицелия в ярко оранжевый цвет. Поликетид диапортин выявлен у 11 штаммов. Два неидентифицированных метаболита синтезировали все штаммы, за исключением 3-х штаммов. Продукция метаболитов варьировала в зависимости от штамма от 25 до 167 мг/л. Идентифицированные вторичные метаболиты были характерны для вирулентных штаммов. Для антрахинонов известна антибактериальная, антифунгальная и фитотоксичная активность.

При исследовании фитотоксичности метаболитов нами был отобран штамм Cry 16, образующий наибольшее количество вторичных метаболитов. Установлено, что минимальная подавляющая концентрация экстракта, влияющая на тест объекты, составила 5 мг/мл – гибель 100 % тест-растений отмечена на 12 сут. При более высоких концентрациях метаболитов (от 10 мг/мл и более) массовая гибель растений свыше 50 % отмечена уже на 4 сут эксперимента, а 100 %-я гибель – на 8 сут. При капельном внесении различных концентраций метаболитов на побеги, листья каштана и яблоки сорта Granny Smith было установлено фитотоксическое действие концентраций, начиная от 4 мг/мл на листьях и 5 мг/мл на побегах и яблоках. Площадь и зона некроза увеличивалась закономерно с увеличением концентрации, минимальное время, при котором некроз развивался до максимальных значений составило 1-3 сут в зависимости от тест-объекта. Таким образом, впервые было показано участие вторичных метаболитов *C. parasitica* в процессе крифонекроза *C. sativa.* Известно, что фитотоксины грибов могут применяться в сельском хозяйстве в качестве основы для гербицидов и фунгицидов, а также для повышения эффективности существующих средств защиты растений.

Список литературы:

Rigling D., Prospero S. // Molecular plant pathology (2018) 19(1), 7–20.
Попов А.П., Белов А.А., Цветков И.Л., Коничев А.С. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2010. № 3. С. 92-97.

Фуроизокумарины гриба *Aspergillus calidoustus* ВКМ F-4916 и оценка их пестицидной активности

Антипова Т.В.[1,2*], Дубовик В.Р.[2], Желифонова В.П.[1], Лукина Е.Г.[2], Баскунов Б.П.[1], Маммери У.А.[3], Смирнов С.Н.[3], Иванушкина Н.Е.[1], Зайцев К.В.[4], Венг Ц.[5], Берестецкий А.О.[2]

[1]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН ФИЦ ПНЦ БИ РАН
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
[3]Химический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет
[4]Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
[5]Факультет защиты растений, Южно-китайский сельскохозяйственный университет

Ключевые слова: изокумарины, асперизокумарин J, фитотоксичность, он-лайн ресурс Pesti-DGI-Net

Грибы рода *Aspergillus* производят широкий спектр разнообразных вторичных метаболитов, обладающих токсичным и терапевтическим потенциалом (Vadlapudi et al. 2017). Многие из этих метаболитов используются как видовые хемотаксономические маркеры (Frisvad et al. 2019). По своей структуре эти соединения относятся к терпеноидам, алкалоидам, поликетидам и др. У *Aspergillus* обнаружено несколько типов поликетидов, среди которых изокумарины с различными структурными особенностями являются важными с практической точки зрения природными соединениями (Bai et al. 2019). Несмотря на то, что структуры многих вторичных метаболитов уже установлены, хемотаксономическое изучение аспергиллов показало, что у многих видов встречаются новые, или не до конца охарактеризованные метаболиты, углубленное изучение которых может привести к открытию новых типов их биологической активности, интересных для применения в различных областях хозяйственной деятельности.

Для поиска гербицидных молекул активно используются расчетные методы хемо- и биоинформатики, апробированные для разработки новых лекарственных препаратов. С использованием имеющегося опыта создания химических гербицидов и с учетом их биологической активности, физико-химических свойств и мобильности в растениях предложены предикторы, которые позволяют отбирать перспективные молекулы. В настоящее время разработана онлайн-платформа CoPLE на основе Pesti-DGI-Net (мультимодальная архитектура глубокого обучения, основанная на двойной интерпретируемости для прогнозирования сходства к пестицидам). Pesti-DGI-Net служит ценным инструментом для рационального проектирования молекул пестицидов (Yang et al 2024).

Целью работы было изучение вторичных метаболитов гриба *A. calidoustus* ВКМ F-4916 и оценка их пестицидной активности.

Объектом исследования был штамм *A. calidoustus* ВКМ F-4916, выделенный из почвы в Краснодарском крае и хранящийся во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН (ВКМ). Идентификация штамма ВКМ F-4916 была проведена с использованием полифазного подхода, основанного на изучении фенотипических, физиологических и генотипических признаков.

В экстракте культуральной жидкости были идентифицированы сидерофор – десферритриацетифузиген и фуроизокумарины – пергиллин, псевдофлектуссин и неидентифицированное соединение. Установление структуры соединения проводили с помощью масс-спектрометрии, одно- и двумерной спектроскопии ЯМР и данных оптического вращения. Предварительное изучение спектров ^{1}H и ^{13}C ЯМР показало значения, близкие к данным асперизокумаринов. Соединение было определено как 7-гидрокси-2-(2-гидроксипропан-2-ил)-7-метил-6,9-дигидро-7H-фуро[3,2-*h*]изохромен-3(2H)-он. В настоящее время описаны структуры асперизокумаринов A-I, поэтому метаболит был назван как асперизокумарин J.

Нами были проанализированы структуры трех метаболитов фуроизокумаринового типа - асперизокумарина J, пергиллина и псевдодефлектусина с помощью он-лайн ресурса Pesti-DGI-Net. Показано, что асперизокумарин J, пергиллин и псевдодефлектусин обладают свойствами пестицидов, в частности, фунгицидов и гербицидов. Пергиллин и псевдодефлектусин имеют более высокий коэффициент подобия пестицидам по сравнению с асперизокумарином J и примерно одинаковый уровень подобия гербицидам. Пестицидная активность у обнаруженных метаболитов, по-видимому, обусловлена наличием изохроманового ядра, имеющего высокий коэффициент

подобия пестицидам. Изучение фитотоксичности на примере роста корня салата показало, что асперизокумарина J в концентрации 500 мкг/мл ингибировал рост длины корня на 85%. В дальнейшем в рамках поиска новых биогербицидных соединений представляет интерес углубленное изучение фитотоксических свойств фуроизокумаринов и их природных аналогов.

Работа по идентификации, поддержанию, культивированию штамма и выделению метаболитов выполнена в ИБФМ РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, установление структуры метаболита и анализ биологической активности проводилась при поддержке гранта РНФ № 24-46-00005 (NSFC 32361133546).

Список литературы:

Yang R., Yan Y., Wei Z., Wang F., Yang G. // Comput. Electron. Agric. 2024. V. 217. P. 108660. doi: 10.1016/j.compag.2024.108660

Vadlapudi V., Borah N., Yellusani K.R., Gade S., Reddy P., Rajamanikyam M., Vempati L.N.S., Gubbala S.P., Chopra P., Upadhyayula S.M., Amanchy R. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 7325. doi: 10.1038/s41598-017-07436-w

Frisvad J.C., Hubka V., Ezekiel C.N., Hong S.B., Nováková A., Chen A.J., Arzanlou M., Larsen T.O., Sklenář F., Mahakarnchanakul W., Samson R.A., Houbraken J. // Stud. Mycol. 2019. V. 93. № 1. P. 1-63. doi: 10.1016/j.simyco.2018.06.001

Bai X., Sheng Y., Tang Z., Pan J., Wang S., Tang B., Zhou T., Shi L., Zhang H. // J. Fungi. 2023. V. 9. P. 261. doi: 10.3390/jof9020261.

Метаболический потенциал грибов *Pseudogymnoascus* spp.

Антипова Т.В. [1,2]*, ***Желифонова В.П.***[1], ***Дубовик В.Р.***[2], ***Лукина Е.Г.***[2], ***Ху Ц.***[3], ***Кочкина Г.А.***[1], ***Берестецкий А.О.***[2]

[1]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН ФИЦ ПНЦ БИ РАН
tatantip@rambler.ru

[2]Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург
[3]Южно-китайский аграрный университет, Гуанчжоу, 510642, Китай

Ключевые слова: вторичные метаболиты, кластеры генов, биосинтез, сидерофор, антимикробная активность, фитотоксичность.

Низкомолекулярные метаболиты микроорганизмов являются основным источником химического разнообразия, которое находит применение в фармацевтических и сельскохозяйственных областях в течение последнего столетия. Огромное видовое разнообразие грибов и множество кластеров биосинтетических генов, которые кодируют биосинтез вторичных метаболитов, обуславливают практически безграничное число метаболических вариаций, являющихся ресурсом для открытия новых полезных биологически активных веществ.

Известно, что грибы обладают универсальной экологической адаптацией и биохимической гибкостью, которые позволили им выживать и распространяться в самых жестких природных условиях (Das et al. 2022). При этом вторичные метаболиты, как правило, не являются необходимыми для роста и развития организмов, поэтому кластеры генов, связанные с их синтезом, часто находятся в «молчащем» состоянии. Их экспрессия напрямую связана с жизненным циклом гриба и средой обитания. Следовательно, стратегии активации или эффективной экспрессии кластеров биосинтетических генов становятся фокусом в исследовании и применении вторичных метаболитов (Pillay et al. 2022). Вторичные метаболиты грибов в зависимости от метаболических путей их образования относят к поликетидам, нерибосомальным петидам, их гибридам, терпенам и пептидам, синтезируемым рибосомами.

В последнее время внимание исследователей все больше привлекают малоизученные и экстремальные среды обитания микроорганизмов с высоким адаптивным потенциалом, большая часть которых обладает потенциальной способностью продуцировать различные вторичные метаболиты. К грибам, хорошо адаптирующимся к низкотемпературным местообитаниям вследствие способности изменять метаболизм при воздействии стрессоров, относятся грибы рода *Pseudogymnoascus* (анаморфа *Geomyces*). Они широко распространены в природе и могут быть обнаружены почти повсеместно от Арктики до Антарктиды. Несмотря на повышенное внимание к этим грибам, для них описано не более двух десятков вторичных метаболитов.

Целью работы было исследование метаболического потенциала штаммов грибов *Pseudogymnoascus* spp., выделенных из различных местообитаний, в том числе из арктических отложений, и оценка их биологической активности.

Объектами исследования служили 8 штаммов грибов *Pseudogymnoascus* spp., ВКМ F- 103, F-3808, F-4513, F-4514, F-4515, F-4516, F-4517, F-4520. Полный геном этих штаммов был исследован ранее (Leushkin et al. 2015). Анализ экстрактов изучали методами ТСХ и ВЭЖХ МС/УФ при помощи хроматографа Acquity UPLC H-class (Waters, США), оснащенного диодно-матричным и моноквадрупольным масс-спектрометрическим (QDa, Waters, США) детекторами.

Анализ биосинтетических кластеров генов (БКГ) биосинтеза вторичных метаболитов с помощью программы antiSMASH в геномах штаммов *Pseudigymnoascus* показал наличие от 27 до 45 БКГ. При этом наибольшее количество БКГ относилось к поликетидсинтазам 1 типа и синтетазами нерибосомных пептидов. У штаммов ВКМ F-4514, F-4516, F-3808 обнаружен БКГ биосинтеза сидерофора. Было установлено, что геномы штаммов *Pseudigymnoascus* содержат 8-13 предполагаемых БКГ биосинтеза известных метаболитов с подобием 9-100%.

При культивировании штаммов в минеральной среде было охарактеризовано 13 неидентифицированных соединений. У трех штаммов ВКМ F-4514, F-4516, F-3808 в экстрактах присутствовал только один метаболит сидерофор десферритриацетилфузиген (DTrF). Таким образом, при культивировании штаммов в данных условиях, по-видимому, экспрессировались

только 10-15% БКГ биосинтеза вторичных метаболитов от числа обнаруженных с помощью биоинформатического анализа.

Изучение антимикробной активности экстрактов и DTrF показало, что они были активны по отношению к *Bacillus subtilis* и *Candida albicans*. Зоны ингибирования роста *B. subtilis* в диапазоне от 3 до 6 мм наблюдались у экстрактов ВКМ F-4513, F-4515, F-4517, F-4520. Ингибирование роста *C. albicans* экстрактами штаммов ВКМ F-103, F-4513, F-4515, F-4517, F-4520 происходило в диапазоне от 1.5 до 6.3 мм. При этом максимальное ингибирование (радиус зоны лизиса 6.3 мм), которое было сравнимо с действием антифунгального препарата клотримазола (радиус зоны лизиса 6.0 мм), наблюдалось у экстрактов ВКМ F-4513 и F-4517. Следует отметить, что метаболиты, обладающие наибольшей биологической активностью, были обнаружены у штаммов, выделенных из многолетнемерзлых отложений Арктики.

Изучение фитотоксичности на примере ингибирования роста корня салата показало, что все экстракты снижали длину корня на 47 - 92%. DTrF способствовал значительному ингибированию (87%) роста корня салата, что согласуется с полученными ранее данными об участии этого метаболита в вирулентности фитопатогенных грибов (Walsh et al. 2021). Листовые высечки осота и отрезки листьев пшеницы были чувствительны к экстрактам штаммов ВКМ F-103, F-4513, F-4515, F-4517, F-4520. Высокий уровень фитотоксичности (диаметр некроза листового диска осота 6 мм) проявил экстракт штамма ВКМ F-4513. Личинки пчелиной огневки были чувствительны к инъекции экстракта ВКМ F-4513, гибель насекомых наблюдалась через 3 сут после обработки.

Таким образом, очевидно, что штаммы *Pseudogymnoascus* spp. обладают большим потенциалом образования вторичных метаболитов, однако в условиях эксперимента большая часть БКГ находилась в “молчащем” состоянии. Показано, что вторичные метаболиты, синтезируемые *Pseudogymnoascus* spp., обладают разнообразной биологической активностью. Наибольшей антимикробной и фитотоксической активностью обладали метаболиты штаммов ВКМ F-4513 и F-4517, выделенные из многолетнемерзлых отложений Арктики. Отмечена энтомотоксическая активность метаболитов штамма ВКМ F-4513. Следовательно, выделение и установление структуры метаболитов у изученных штаммов *Pseudogymnoascus* spp весьма перспективно для применения их в различных областях хозяйственной деятельности.

Исследование поддержано грантом РНФ-NSFC № 24-46-00005(32361133546).

Список литературы:

Das T., Al-Tawaha A.R., Pandey D.K., Nongdam P., Shekhawat M.S., Dey A., Choudhary K., Sahay S. In: Sahay, S. (eds) Extremophilic fungi. Springer, Singapore, 2022

Leushkin E.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Sutormin R.A., Gerasimov E.S., Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Vasilenko O.V., Kondrashov A.S., Ozerskaya S.M. // BMC Genomics. 2015. V. 16. 400.

Pillay L.C., Nekati L., Makhwitine P.J., Ndlovu S.I. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. 815008.

Гидролитические свойства актиномицета из водорослевой пленки с поверхности скального обнажения известняков

Боков Н.А.[1], Широких И.Г.[1]

[1]ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого»
nikita-bokov@mail.ru

Ключевые слова: актиномицеты, известняк, целлюлазная активность, хитиназная активность, водорослевые пленки.

Актуальность исследования актиномицетов, выделяемых из различных экологических ниш, обусловлена их высоким биосинтетическим потенциалом. Долгое время изучение актиномицетов было связано в основном с поиском штаммов с антимикробной активностью, включая оценку культур, полученных из месторождений известняка [1]. В меньшей степени изучен гидролитический потенциал мицелиальных прокариот, в частности, целлюлазная и хитиназная активности, которые представляют интерес для разработки технологий, востребованных в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, экологии и других направлениях биоэкономики.

Известно о сравнительно широком распространении актиномицетов в природных водорослевых ценозах – местах первичного педогенеза на выходах карбонатных пород [2]. Экспериментально показано, что в ассоциациях с микроводорослями актиномицеты могут изменять антимикробную активность [3]. Возможно, что актиномицеты-ассоцианты микроводорослей могут отличаться и другими физиолого-биохимическими свойствами, например, активностью гидролитических ферментов. Цель работы – оценка целлюлазной и хитинолитической активности культуры актиномицета, полученной из водорослевой пленки с поверхности известнякового щебня.

Объектом исследования служил штамм, по культуральным и морфологическим свойствам соответствующий типичным для рода *Streptomyces.* Целлюлазная активность штамма *Streptomyces* sp. C7-7 (средний диаметр зон гидролиза КМЦ 46,3±0,6 мм) была выявлена в тесте с Конго красным [4]. Способность к хитинолизу установлена по наличию зон гидролиза хитина вокруг колоний на плотной минеральной среде с коллоидным хитином (5±0 мм). Количественную оценку целлюлазной и хитиназной активности оценивали в жидких культурах с реактивом ДНС [5]. В зависимости от задачи, в жидкую минеральную среду вносили в качестве единственного источника углерода природный целлюлозный субстрат (солому, отруби ржаные, опил березы) (10 г/л) или коллоидный хитин (10 г/л). Повторность опыта с каждым из субстратов трехкратная. Культивировали стационарно при 28ºС в течении 24, 48, 72, 96, 128 час, в случае целлюлозосодержащих субстратов и 7, 10 и 14 сут при выращивании штамма на среде с хитином. Ферментативную активность измеряли в супернатантах при 50°С и pH=5 по начальной скорости образования редуцирующих сахаров, концентрацию которых определяли при 540 нм спектрофотометрически.

Результаты количественной оценки целлюлазной активности при ферментации различных целлюлозных субстратов представлены в динамике (табл. 1). Наиболее высокой активность целлюлазы (269,58±69,44 Ед./10 мин) была спустя 72 час от начала культивирования на субстрате в виде ржаных отрубей. Ферментация двух других субстратов протекала с меньшей в 5,3 (солома) и 6,7 (опил) раз активностью, но ее пики так же отмечены через 72 час роста культуры.

Табл. 1 Динамика целлюлазной активности штамма *Streptomyces* sp. C7-7 на различных целлюлозосодержащих субстратах

Субстрат	Продолжительность роста культуры, час			
	24	48	72	168
	Ед./10 мин			
Отруби ржаные	101,04±13,64	61,25±45,62	269,58±69,44	114,38±41,45
Березовый опил	0	30,0±9,76	40,42±20,16	0
Солома	39,3±16,40	49,17±34,74	50,83±25,85	40,83±3,66

Гораздо более продолжительный период роста потребовался *Streptomyces* sp. C7-7 для реализации своего хитинолитического потенциала. Пик хитиназной активности (43,33±8,72 Ед./10

мин) был достигнут лишь на 10 сут культивирования, а на 14 сут активность хитиназы не обнаруживалась (табл. 2).

Табл. 2 Хитиназная активность штамма *Streptomyces* sp. C7-7 в динамике на среде с коллоидным хитином

Субстрат	Продолжительность роста культуры, сут		
	7	10	14
	Ед./10 мин		
Коллоидный хитин	14,58±4,61	43,33±8,72	0

В целом установлено, что изучаемый штамм *Streptomyces* sp. C7-7, обладает высоким гидролитическим потенциалом, способен расти и гидролизовать сложные источники углерода (солома, березовый опил, хитин). Выявление штамма с комплексом ценных гидролитических свойств позволяет рекомендовать его в качестве кандидатного для использования в агробиотехнологиях утилизации отходов и улучшения плодородия почвы.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого» (тема № FNWE-2025-0005).

Список литературы:

1. Syiemiong D., Jha D.K. Antibacterial potential of actinobacteria from a limestone mining site in Meghalaya, India // J Pure Appl Microbiol. 2019. V. 13(2). P. 789–802.
2. Зенова Г.М., Калакуцкая А.Н. Характеристика водорослевого и бактериального компонентов альгобактериальных ценозов на выходах карбонатных пород // Микробиология. 1993. Т. 62. В. 1. С.156–162.
3. Лихачева А.А., Зенова Г.М., Калакуцкий Л.В. Взаимодействие актиномицетов и водорослей в смешанных культурах // Микробиология. 10987. Т 56. В.2 С. 309–311.
4. Carder J.H. Detection and quantitation of cellulase by congo red staining of substrate in a cup-plate diffusion assay // Ann. Periodontal. Anal. Biochem. 1986. Vol. 153. P. 93–114.
5. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical Chemistry. 1959. V. 31, № 3. P. 426–428. – DOI: 10.1021/ac60147a030.

Влияние предпосевной инокуляции семян *Bacillus thuringiensis* на всхожесть и ростовые параметры сельскохозяйственных культур

Дрокина У.Д.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь
braz123@yandex.ru

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, сельскохозяйственные культуры; повышение всхожести; стимулирование роста культур.

В настоящее время, в качестве альтернативы традиционным удобрениям, все чаще используется микробное разнообразие, а также биопрепараты на их основе.

Bacillus thuringiensis - грамположительная почвенная бактерия, наиболее часто используемая в качестве биологического пестицида во всем мире [1]. Различные штаммы *Bacillus thuringiensis* продуцируют разные типы токсинов, каждый из которых поражает узкую таксономическую группу насекомых [2]. Поэтому их токсины стали использоваться в качестве местных пестицидов для защиты сельскохозяйственных культур. Таким образом, использование *Bacillus thuringiensis* оказалось чрезвычайно успешным и полезным, что привело к повышению урожайности и сокращению использования химических пестицидов [3].

В эксперименте участвовали следующие сорта сельскохозяйственных культур пшеницы мягкой озимой: «Барыня» (П1), «Арсенал» (П2), «Идиллия» (П3), «Морец» (П4), «Зустрич» (П5), «Петровчанка» (П6), «Иридас» (П7), «Прикумская 140» (П8), «Корона» (П9), «Степной янтарь» (П10); ярового ячменя «Еней УА» (Яч. 1), «Скиф» (Яч. 2), «Евсей» (Яч. 3) и «Одесский 22» (Яч. 4). В эксперименте также участвовали сорт сои «Гринфи 3» (Соя), гороха «Рассвет» (Гор.) и нута «Триумф» (Нут).

Для эксперимента была изготовлена культуральная жидкость *Bacillus thuringiensis*, с титром клеток 150 х 10^6 клеток/мл.

Проведено исследование по предпосевной обработке семян культуральной жидкостью *Bacillus thuringiensis* с целью повышения всхожести и увеличения ростовых параметров особо важных сельскохозяйственных культур.

Семена были помещены в стерильные чашки Петри, в количестве 10 штук на каждую чашку, и обработаны культуральной жидкостью, разбавленной в 2000 раз водой. Расход рабочей жидкости составляет 20 л на 1 тонну семян.

Контролем служат семена, обработанные водой из расчета 20 литров воды на 1 тонну семян.

Спустя сутки оценивалась степень прорастания семян, обработанных культуральной жидкостью относительно контрольных образцов (по 10 семян каждого образца).

Табл. 1 Количественная оценка проросших семян

Образец	**П 1**	**П 2**	**П 3**	**П 4**	**П 5**	**П 6**	**П 7**	**П 8**	**П 9**	**П10**	**Яч 1**	**Яч 2**	**Яч 3**	**Яч 4**	**Гор**	**Соя**	**Нут**
К	6	7	4	6	4	5	7	6	6	5	3	7	5	8	7	4	6
Вас	8	7	4	7	4	6	8	9	9	6	3	7	5	8	9	6	8

По итогам первой части эксперимента, *Bacillus thuringiensis* повысил всхожесть семян пшеницы на 14-50%, гороха на 29%, сои на 50%, нута на 25%. На ячмень влияния не оказал.

Во второй части эксперимента был произведен посев обработанных семян и оценка степени стимулирования роста сельскохозяйственных культур.

Семена проращивались в помещении с регулируемым климатом при температуре 22±1°С в течение 3-х суток в торфе. Через указанное время проростки отмывали от торфа и измеряли длину надземной части и корневой системы. Эксперимент производился в трехкратном повторении. После анализа данных был получен усредненный результат.

Табл. 2 Результаты измерения длины (см) надземной части (н) и корневой системы (к) пророщенных семян

Образец		П1	П2	П3	П4	П5	П6	П7	П8	П9	П10	Яч1	Яч2	Яч3	Яч4	Гор	Соя	Нут
К	*н*	8	9	10	12	10	10	8	7	11	12	11	6	5	9	1	6	2
	к	5	7	10	8	8	2	4	3	5	7	3	5	5	4	6	5	2
Вас	*н*	7	12	3	14	12	9	11	12	10	10	7	0	9	0	3	2	3
	к	3	11	2	9	10	4	4	8	4	5	4	1	5	0	8	1	2

На основании полученных результатов, была произведена оценка стимулирования роста культур, путем подсчета отношений длин корней и длин стеблей в контрольных и опытных образцах.

Результаты исследования

Отношение длины стебля опытных семян пшеницы к контрольным увеличилось в 0,3-1,71 раза, ячменя 0,63-1,8 раза, гороха в 3 раза, сои в 0,3 раза, нута в 1,5 раза. Отношение длины корня опытных семян пшеницы к контрольным увеличилось в 0,2-2.66 раза, ячменя в 0,2-1,3, гороха в 1,3 раза, сои в 0,2 раза. Однако на некоторые сорта пшеницы, ячменя и на сою стимулирующий эффект не был оказан.

Список литературы:

1. Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007. P. 547–559.
2. Khalilov I., Kadirova G., Khalilova F. Multifuctional properties of *Bacillus thuringiensis* bacteria strains and a new approach in struggle with a cotton bollworm // International journal of Advanced Science and Technology. 2020. P.1652-1658.
3. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol J. 2011. P. 283-300.

Характеристика нового штамма-деструктора *epsilon*-капролактама *Brevibacterium epidermidis* BS3 и перспективы его использования в биоремедиации

Есикова Т.З.

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

Ключевые слова: биодеградация*, Brevibacterium, epsilon*-капролактам, 6-аминогексановая кислота, олигомеры нейлона.

Epsilon-капролактам (далее капролактам, КАП) – один из наиболее востребованных на мировом рынке химических продуктов, которое используется для производства поликапролактама, более известного как нейлон-6. В процессе полимеризации, образующиеся при гидролизе КАП молекулы 6-аминогексановой кислоты соединяются друг с другом посредством амидной связи, формируя молекулу нейлона-6. Продукты полимеризации, как правило, содержат низкомолекулярные линейные и циклические олигомеры 6-аминогексановой кислоты, которые традиционно называют олигомерами нейлона (ОЛН). Капролактам, 6-аминогексановая кислота и ее линейные и циклические олигомеры являются основными компонентами сточных вод и твердых отходов, образующихся при производстве КАП и нейлона-6. В настоящее время стоки сжигаются, а твердые отходы подвергаются захоронению (Baxi, 2014). Из-за токсического воздействия на живые организмы данные поллютанты представляют опасность для окружающей среды и здоровья человека. Отсутствие системных исследований микробных деструкторов КАП и ОЛН является сдерживающим фактором развития безопасных и экономически выгодных технологий биологической очистки отходов химических предприятий и биоремедиации загрязненных территорий. В связи с этим выделение микроорганизмов-деструкторов и изучение у них особенностей метаболизма КАП и его производных является актуальной задачей.

Из активного ила очистных сооружений производства КАП (“ЩекинАзот”, г. Щекино, Тульская обл.) методом накопительных культур был выделен грамположительный бактериальный штамм BS3, способный утилизировать КАП в качестве единственного источника углерода и энергии. На основании изучения фенотипических свойств, а также секвенирования гена 16S rRNA (JN787123) штамм был идентифицирован как представитель рода *Brevibacterium* (класс *Actinobacteria*). Важно отметить, что деструкторы КАП, относящиеся к данному роду*,* были выделены и охарактеризованы впервые.

Исследуемый штамм рос в широком диапазоне концентраций ксенобиотика - от 0.5 до 22.0 г/л, оптимальная концентрация КАП, при которой наблюдались максимальные значения удельной скорости роста и оптической плотности, составляла 1.0 г/л. В опытах по деградации КАП методом газовой хроматографии было показано, что изолят полностью утилизировал 1000 мг/л субстрата в течение 160 ч, максимальное потребление ксенобиотика (до 95%) происходило в экспоненциальной фазе роста.

Особый интерес представляет тот факт, что *B. epidermidis* BS3 обладает уникальной способностью разлагать не только КАП, но и низкомолекулярные линейные олигомеры нейлона, что отличает его от описанных ранее узкоспецифичных деструкторов КАП и/или олигомеров. Возможность одновременной биодеградации КАП и ОЛН в качестве единственных источников углерода без добавления каких-либо дополнительных факторов роста одной бактериальной культурой до сих пор не была описана. Известно, что ферменты, осуществляющие гидролиз амидной связи на первом этапе катаболизма КАП (*epsilon*-капролактамгидролаза) или ОЛН (6-аминогексаноатдимергидролаза), в результате чего в обоих случаях происходит образование молекулы АДК, обладают узкой ферментной специфичностью (Есикова и др., 2014). На наш взгляд, способность нового штамма-деструктора разлагать КАП и ОЛН может быть обусловлена наличием двух специфических гидролаз, одна из которых активна в отношении ОЛН, а другая - в отношении

КАП. В то же время нельзя полностью исключить существования у данной бактерии одного фермента с широкой субстратной специфичностью, обладающего активностями как 6-аминогексаноатдимергидролазы, так и *epsilon*-капролактамгидролазы. Штамм *B. epidermidis* BS3 также утилизировал 6-аминогексановую и адипиновую кислоты – интермедиаты катаболизма КАП, что косвенно указывает на то, что деградация олигомеров у него происходит по пути разложения мономера.

Повышенное внимание в данной работе было уделено оценке перспектив применения нового штамма для биологической очистки промышленных отходов производства КАП и нейлона-*6*. По литературным данным, количество КАП в производственных стоках может варьировать от 1360 до 3600 мг/л в зависимости от конкретного предприятия, а его содержание в твердых отходах может достигать 34% (вес/объем) (Baxi, 2014). В связи с этим, толерантность микроорганизмов-деструкторов, используемых в биотехнологиях очистки отходов, к высоким концентрациям поллютантов имеет важное значение. В ряде работ было показано, что диапазон концентраций КАП для роста большинства бактерий - деструкторов составляет 1.0-5.0 г/л (Baxi et al., 2019). Новый бактериальный штамм *B. epidermidis* BS3 в этом отношении превосходит описанные до сих пор бактерии и может быть использован для биоремедиации загрязненных территорий и производственных отходов с высокой концентрацией токсиканта. Широкий спектр токсичных антропогенных соединений, утилизируемых новой бактерией, также может иметь важное практическое значение для разработки технологий биологической очистки отходов производства и переработки КАП, содержащих как сам мономер, так и низкомолекулярные фракции олигомеров.

Список литературы:

1. *Baxi, N.N.* Feasibility studies of *in situ* bioremediation of nylon-6 oligomer waste contaminated soil. Curr. Res. Microbiol. Biotechnol. 2014, V.3, P.378–383.
2. *Есикова Т.З., Акатова Е.В., Таран С.А*. Бактерии-деструкторы низкомолекулярных линейных олигомеров капролактама. Прикл. Биохим. Микробиол. 2014. Т.50, №5, С.481-489.
3. *Baxi, N.N.; Patel, S.; Hansoti. D*. An *Arthrobacter citreus* strain suitable for degrading ε-caprolactam in polyamide waste and accumulation of glutamic acid. AMB Express. 2019. 9. article number 161. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0887-1.

Скорость роста колонии Aspergillus unguis в присутствии Stenotrophomonas rhizophila

Ефимова В.А., Ахапкина С. С., Селезнев А. О.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород
1555004@bsuedu.ru

Ключевые слова: биологические фунгициды, *Stenotrophomonas rhizophila*, антагонистическая активность, *Aspergillus unguis*, биоконтроль

Согласно открытым источникам, с 2022 по 2025 годы общее количество фунгицидов увеличилось на 14,8%. При этом, ассортимент препаратов на основе микроорганизмов расширился на 40,4%, тогда как доля фунгицидов химического происхождения увеличилась всего на 12,5% [Информация в Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации по состоянию на 30 апреля 2025]. В связи с растущим спросом на биологическое земледелие, необходимо увеличивать разнообразие микроорганизмов — перспективных основ для фунгицидов. *Stenotrophomonas rhizophila* — ризобактерия, известная способностью продуцировать антимикробные метаболиты, такие как хитеназы и сидерофоры, которые подавляют рост патогенов за счет конкуренции за ресурсы и прямого ингибирования [1]. Плесневые грибы, например *Aspergillus unguis*, способны к биосинтезу множества биологически активных веществ, вследствие чего они могут представлять угрозу как для сельскохозяйственных культур, вызывая гнили и снижение урожайности, так и для здоровья человека [2].

Целью данной работы было изучение влияния *Stenotrophomonas rhizophila* 10.ЕФ2.02 на скорость роста колоний *Aspergillus unguis*. Штамм бактерий *Stenotrophomonas rhizophila* 10.ЕФ2.02 был выделен из сточной воды промышленного предприятия и идентифицирован по гену 16S рРНК ранее.

Антагонистическую активность *S. rhizophila* 10.ЕФ2.02 в отношении гриба *A. unguis* ВКМ F-1754 оценивали при совместном культивировании на плотной питательной среде Сабуро (состав: пептон — 10 г/л, сахароза — 20 г/л, агар — 20 г/л). Для этого стерильным пробочным сверлом вырезали агаровые диски, содержащие культуру бактерии, выросшей «газоном» на плотной питательной среде (состав: пептон — 30 г/л, агар — 20 г/л) и равномерно распределяли по периферии чашек Петри, содержащих модифицированную среду Сабуро. В чашки помещали фильтровальный диск, пропитанный суспензией спор гриба. Посевы инкубировали при 25°С. Каждые сутки измеряли диаметр колоний в двух перпендикулярных направлениях. Длительность экспозиции - 5 суток. Достоверность различия оценивали с использованием критерия Стьюдента.

В ходе эксперимента выявлено, что степень подавления скорости роста колонии плесневого гриба *A. unguis* ВКМ F-1754 в присутствии *S. rhizophila* составила 36,39%. Средний квадратический диаметр колоний *A. Unguis* на 5 сутки в контроле составил 40,0 ± 1,74 мм, тогда как в опыте — 30,5 ± 5,78 мм, при уровне достоверности $p<0,5$.

Таким образом, можно предположить, что *S. rhizophila* обладает микостатической активностью в отношении *A. unguis* ВКМ F-1754, что делает штамм перспективным кандидатом для разработки биологических препаратов контроля и профилактики грибковых инфекций. Кроме того, согласно литературным данным, *S. Rhizophila* способна ингибировать развитие фитопатогенов, включая *Rhizoctonia*, с эффективностью свыше 90%, что связано с выработкой β-фенилэтанола и додеканола [3]. Однако необходимы дальнейшие исследования активности в отношении других тест-культур.

Фунгициды на основе микроорганизмов могут стать альтернативой традиционным химическим препаратам, особенно в условиях растущей резистентности патогенов. Реализация этого подхода позволит минимизировать экологический ущерб, связанный с применением токсичных соединений, и повысить устойчивость агроэкосистем к грибковым инфекциям.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИУ «БелГУ» FZWG-2020-0021.

Список литературы:

1. Berg G., Martinez J.L. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the Stenotrophomonas maltophilia complex? // Front. Microbiol. 2015. Vol. 6. P. 241. doi: 10.3389/fmicb.2015.00241
2. Domingos L.T.S., Martins R.d.S., Lima L.M.d., Ghizelini A.M., Ferreira-Pereira A., Cotinguiba F. Secondary Metabolites Diversity of Aspergillus unguis and Their Bioactivities: A Potential Target to Be Explored // Biomolecules. 2022. Vol. 12. P. 1820. https://doi.org/10.3390/biom12121820
3. Ryan R.P., Monchy S., Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M.B., Dow J.M. The versatility and adaptation of bacteria from the genus Stenotrophomonas // Nature Reviews Microbiology. 2009. Vol. 7, № 7. P. 514–525. doi:10.1038/nrmicro2163.

Выделение из разложившейся древесины лигнинолитических микроорганизмов и их характеристика

Зотова О.А., Маканина О.А.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород
1555110@bsuedu.ru

Ключевые слова: биодеградация лигнина, «зеленая» биотехнология, лакказа, тирозиназа, активность, обесцвечивание красителей, галотолерантность, ацидофильность.

Проблема утилизации лигноцеллюлозных отходов лесоперерабатывающей промышленности является одной из наиболее актуальных в контексте «зеленой» биотехнологии. Лигнин – это сложное, высокомолекулярное органическое соединение, которое является одним из основных компонентов клеточных стенок растений, наряду с целлюлозой и гемицеллюлозой. На данный момент Россия входит в топ – 10 стран, лидирующих по запасам древесного сырья и лесных ресурсов. Ежегодно в России образуется около 35,7 млн м³ древесных отходов. Наиболее отходоемкие регионы – Северо-Кавказский и Южный федеральный округа (Колесникова, 2013). Ключевую роль в деструкции устойчивого полимера лигнина играют специализированные микроорганизмы, продуцирующие комплексы ферментов, таких как лакказы, пероксидазы и тирозиназы (Minussi, 2007, Купряшина, 2013).

Целью работы было выделение, поиск и характеристика природных изолятов с лигнинолитическим потенциалом.

Источником для выделения бактерий служила частично разложившаяся древесина шпал, отобранная на кругобайкальской железной дороге. На первом этапе кусочки древесины раскладывали на поверхность агаризованной LB (на 1 литр среды: 10 г - пептона, 5 г - дрожжевого экстракта, 10 г - NaCl) среды, на которую дополнительно было нанесено дизельное топливо. Чашки анализировали через 7 суток и отбирали отличающиеся друг от друга колонии. Микроорганизмы выделяли в чистую культуру на средах LB и Чапека (состав на 1 литр среды: калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,7 г; калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,3 г; магний сернокислый - 0,5 г; натрий азотнокислый - 2 г; калий хлористый - 0,5 г; железо сернокислое закисное - 0,01 г; сахароза - 3 г). Проводили морфологическую (окраска по Граму), культуральную и физиолого-биохимическую характеристику изолятов. Ферментативную активность (лакказную, тирозиназную, целлюлазную, амилолитическую, каталазную) определяли на агаризованных средах с соответствующими субстратами (Давранов, 2023). Лигнинолитический потенциал оценивали по способности к обесцвечиванию индикаторных красителей (Azure B, Indigo Carmine, Congo Red и др.) в жидкой и на твердой средах (Bandounas, 2011).

Из образца было выделено 7 чистых культур микроорганизмов, обозначенные как 1.1, 1.2M, 1.2P, 1.3C, 1.3J, 2.2, 2.3. Выделенные бактерии представляли собой преимущественно грамположительные кокки и палочки, являющиеся аэробными мезофилами. Проверка оптимальных условий для роста изолятов показала, что большинство штаммов предпочитали слабощелочные условия (pH 8), при этом изолят 2.2 проявил ацидофильность (оптимум при pH 4), а штаммы 1.1 и 2.3 – выраженную галотолерантность (рост при 10-15% NaCl).

Способность к гидролизу крахмала выявлена только у изолятов 1.2M, 1.3C и 2.2. Остальные штаммы амилолитической активностью не обладали. При этом все без исключения культуры показали положительную каталазную реакцию.

Ферментативный скрининг выявил несколько перспективных культур:

- Изоляты 1.2M и 1.3J проявляли лакказную активность.
- Изолят 1.3C обладал комплексной активностью: лакказной, тирозиназной и целлюлазной.
- Изолят 2.2 показал целлюлазную активность.

Наибольший лигнинолитический потенциал, подтвержденный в тестах на обесцвечивание красителей, показали культуры 1.2M и 1.3C. Они эффективно обесцвечивали Indigo Carmine (до 40% в жидкой среде) и Congo Red, причем осадок клеток оставался неокрашенным, что свидетельствует

о ферментативной деградации, а не сорбции красителя. Штамм 2.2 показал высокую активность в отношении Azure B (70% осветления).

В результате работы были выделены и охарактеризованы микроорганизмы из разложившейся древесины, обладающие лигнинолитическим потенциалом. Культуры 1.2М и 1.3С, проявляющие комплекс ферментативных активностей (лакказа, тирозиназа, целлюлаза) и способность к деградации ароматических красителей, являются наиболее перспективными объектами для дальнейших исследований. Их потенциальное применение включает биоремедиацию загрязненных сред, переработку древесных отходов и разработку технологий в области биоэнергетики.

Список литературы:

1. Колесникова А. В. Анализ образования и использования древесных отходов на предприятиях лесопромышленного комплекса России // Актуальные вопросы экономических наук. – 2013. – №33. – С.116-120.
2. Давранов, К.Д., Кулонов А.И., Кондрашева К.В. Оценка ферментативной активности галотолерантных микроорганизмов из природных образцов Приаралья // Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. – 2023. – №7. – С.14-15.
3. Minussi, R.C., Pastore G.M., Durán N. Laccase induction in fungi and laccase N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. // Bioresour Technol – 2007. – Vol 98. – P. 158-164.
4. Купряшина, М. А., Ветчинкина Е. П., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Индукторы активности mn-пероксидазы и лакказы *Azospirillum*. Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – №33. – С.563-566.
5. Bandounas, L., Wierckx, N.J., de Winde, J.H. et al. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. // BMC Biotechnol – 2011. – Vol. 94 – P. 1-11.

Выживаемость бактерий-деструкторов при культивировании с растворителями и хладагентами

Иминова Л.Р., Поливцева В.Н., Абашина Т.Н., Сузина Н.Е., Соляникова И.П.

uzdleila90@gmail.com

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, выживаемость, растворители.

Источники загрязнения окружающей среды разнообразны, они имеют как природное, так и синтетическое происхождение, именно поэтому определение деградативного потенциала изолятов, выделенных как из образцов, загрязненных токсикантами, так и из почв, не подвергавшихся антропогенной нагрузке, является перспективным направлением научных исследований и основой для создания биопрепаратов для очистки загрязненных объектов окружающей среды от токсикантов. Соединения, основанные на гидрофторуглеродах, обладают высокой токсичностью и в большинстве случаев являются парниковыми газами. Фреон R404A, представляющий собой хладагент на основе ГФУ, был разработан в середине 1990-х годов как замена хлорфторуглеродов (ХФУ), таких как R12 и R502, без разрушительного воздействия на озоновый слой. Этот хладагент является смесью пентафторэтана, 1,1,1,2 тетрафторэтана и 1,1,1-трифторэтана (R125/R134a/R-143a) (Б.Н. Максимов, 1996). Хотя R404A не разрушает озоновый слой, он является парниковым газом и, как следствие, способствует глобальному потеплению при выбросе в атмосферу. Кроме того, его широкое применение привело к утечке большого количества вещества из сломанных или неисправных систем. На данный момент информация о способности бактерий использовать хладагенты как единственный источник углерода и энергии является ограниченной.

Целью данной работы было установление степени устойчивости бактерий к высокотоксичным соединениям.

Методом накопительного культивирования из различных типов почв и нефтешлама были выделены изоляты, способные к деструкции фенола, углеводородов нефти, пестицидов, целлюлозы, изопрена, тетрахлорметана, хлороформа и фторсодержащих хладагентов. На разных этапах исследования штаммы культивировали на минеральной среде, следующего состава, г/л: Na_2HPO_4 - 0,7; KH_2PO_4 – 0,5; NH_4NO_3 – 0,75;$MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0,2; $MnSO_4$ – 0,001; $FeSO_4$ - 0,02; с использованием в качестве единственного источника углерода и энергии фенол до 2 г/л, нефть, пиноксаден, бифенил, изопрен, глицерин, смесь пентафторэтана, 1,1,1,2 тетрафторэтана, 1,1,1-трифторэтана. После внесения клеток в колбу с питательной средой отбиралась так называемая «нулевая проба», относительно которой в дальнейшем проводилось измерение оптической плотности при $\lambda = 590$ нм. Оптическая плотность промерялась с использованием спектрофотометра “UV-1800 (Shimadzu, Япония). Прирост биомассы оценивали методом подсчета колониеобразующей способности клеток (КОЕ) сразу после внесения клеток, далее через каждые 24 часа. Все этапы проведения экспериментов контролировались микроскопическими исследованиями. Жизнеспособность клеток оценивали подсчетом колониеобразующей способности клеток (КОЕ/мл) и путем окрашивания клеток флуоресцентным красителем LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, США).

В ходе исследования было определено, что несмотря на то, что большинство выделенных изолятов были способны к деструкции целого ряда токсичных соединений, таких как фенол, нефть, пестициды, бифенил, толуол, лишь несколько штаммов могли использовать хладагенты в качестве единственного источника углерода и энергии. Штамм *Pseudomonas stutzeri* S1 при росте на фреоне как единственном источнике углерода и энергии увеличивал биомассу через 48 часов культивирования в 10 раз, с последующим сохранением титра бактерий в течение 20 суток, в то же время в аналогичных условиях, штамм *Microbacterium paraoxydans* M1 увеличивал биомассу в 7 раз, с сохранением высокого титра бактерий на протяжении 17 суток. Анализ динамики КОЕ штамма, выделенного из загрязненной нефтепродуктами почвы, *Rhodococcus qingshengii* R1 при культивировании в минеральной среде с фреоном показал снижение в 1,5 раза через 24 часа с последующим увеличением в 10 раз от исходной численности к 3 суткам от начала эксперимента. Тогда как некоторые штаммы были способны увеличивать биомассу, используя высокотоксичные фторсодержащие соединения, другие, в тех же условиях, демонстрировали устойчивость к данным соединения. При культивировании на минеральной среде, единственным источником углерода и энергии, в которой был фреон R404a штамм *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex1 проявлял

устойчивость и сохранял исходный титр в течении 14 дней, а штамм *E. alkaliphilum* Ex2 увеличивал биомассу в 15 раз на 2-е сутки культивирования в тех же условиях.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что представители различных родов бактерий способны использовать фреоны как единственный источник углерода и энергии. Полученные в ходе исследования данные могут послужить основой для изучения механизмов деструкции поллютантов и значительно расширить информацию о их метаболизме.

Список литературы:

1. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. // Изд-во Академии наук СССР - 1952.
2. Максимов, Б. Н. Охрана окружающей среды в металлургической промышленности / Экология / Б. Н. Максимов // Сталь. – 1996. – N 9. – с. 78.
3. Трегер Ю. А. Четыреххлористый углерод // Химическая энциклопедия: в 5 т. / Гл. ред. Н. С. Зефиров. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1998. — Т. 5: Триптофан — Ятрохимия. — с. 392—393. — 783 с. — 10 000 экз. — ISBN 5-85270-310-9.

Идентификация и биокаталитическая характеристика новых стероид-трансформирующих актиномицетов: синтез 20β-восстановленных прогестинов - биорегуляторов репродуктивной функции костистых рыб

Коллеров В.В., Брагин Е.Ю., Пошехонцева В.Ю., Шутов А.А., Сузина Н.Е., Донова М.В.

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

Ключевые слова*:* Актиномицеты*, Streptomyces rochei,* биоконверсия, прогестины*,* 20β-восстановление.

Актиномицеты, широко распространенные в наземных и водных экосистемах и существующие как в свободноживущей форме, так и как комменсалы или симбионты других организмов, помимо известной способности синтезировать ряд ценных вторичных метаболитов, таких как антибиотики, ферменты, противоопухолевые соединения и иммуносупрессоры, играют важную роль в области структурной модификации стероидных соединений (Donova et al., 2007; Wang et al., 2022; Maltseva et al., 2024; Rui et al., 2025). Для культур актиномицетов показана способность осуществлять различные модификации стероидов, катализируя реакции дегидрирования, гидроксилирования, а также восстановления (Szaleniec et al., 2018; Fufaeva et al, 2023; Fernández-Cabezón et al., 2016). Тем не менее, проблема невысокой активности и селективности катализируемых реакций многими известными штаммами диктует необходимость поиска новых биокатализаторов структурной модификации стероидных соединений.

Целью настоящего исследования являлась идентификация и биокаталитическая характеристика четырёх стероид-трансформирующих актиномицетных изолятов, ранее выделенных с кожных слизистых покровов африканской лягушки *Xenopus laevis*.

В ходе работы, на основании данных ТСХ, ВЭЖХ, масс-спектрометрического и ЯМР-спектроскопического анализов метаболитов конверсии стероидных субстратов прегнанового ряда была показана способность изучаемых актиномицетных изолятов катализировать реакции 20β- и 20α-восстановления. Наиболее активно бактериальные культуры проявляли себя в отношении кортексолона, продуцируя свыше 90% 20β-восстановленного производного (20β-ОН-кортексолона), представляющего интерес в качестве основного прогестина - биорегулятора репродуктивной функции костистых рыб. Гидрокортизон и прогестерон слабо трансформировались актиномицетными изолятами с накоплением в среде конверсии не более 25% 20β-восстановленных производных за всё время инкубации (96 ч). Примечательно, что в случае биоконверсии 17α-ОН-прогестерона наблюдалось преимущественно 20α-восстановление с синтезом до 70% 17α,20α-диОН-прогестерона в варианте с наиболее активным изолятом. Полученные результаты указывают на возможное наличие в клетках актиномицетов двух ферментов, один из которых катализирует 20β-восстановление, в то время как другой - 20α-восстановление, при этом его активность проявляется исключительно в отношении 17α-ОН-прогестерона.

С использованием анализа последовательности гена 16S рРНК, полногеномного секвенирования, DDH и ANI анализов была проведена идентификация исследуемых актиномицетов и установлена их принадлежность к виду *Streptomyces rochei*. В ходе работы также был определен индуцибельный характер фермента, катализирующего реакцию 20β-восстановления и выявлены ключевые факторы, способствующие максимальному проявлению целевой активности стрептомицетным штаммом в отношении кортексолона с выходом целевого продукта 20β-ОН-кортексолона до 95% при нагрузке стероидного субстрата свыше 30 г/л, что значительно превосходит все известные на сегодняшний день данные литературы по эффективности микробиологического синтеза 20β-восстановленных прогестинов (Gerber et al., 2016; Doden et al., 2019; Devendran et al., 2017).

Благодарность.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122040500054-3).

Список литературы:

1. Donova, M.V. Transformation of steroids by actinobacteria: A review. *Appl Biochem Microbiol*. 43, 1–14 (2007). https://doi.org/10.1134/S0003683807010012
2. Wang, X.X., Ke, X., Liu, Z.Q., Zheng, Y.G. Rational development of mycobacteria cell factory for advancing the steroid biomanufacturing. *World J Microbiol Biotechnol*. 38, 1912022 (2022) https://doi.org/10.1007/s11274-022-03369-3
3. Maltseva, P.Y., Plotnitskaya N.A., Ivshina, IB. Transformation of terpenoids and steroids using actinomycetes of the genus *Rhodococcus*. *Molecules*. 29, 3378 (2024) https://doi.org/10.3390/molecules29143378
4. Rui, S. et al. Biological activity of secondary metabolites of actinomycetes and their potential sources as antineoplastic drugs: a review. *Front Microbiol*. 8, 1550516 (2025) https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1550516
5. Szaleniec, M., Wojtkiewicz, A.M., Bernhardt, R., Borowski, T., Donova, M. Bacterial steroid hydroxylases: enzyme classes, their functions and comparison of their catalytic mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102, 8153-8171 (2018) https://doi.org/10.1007/s00253-018-9239-3
6. Fufaeva, S.R., Dovbnya, D.V., Ivashina, T.V., Shutov, A.A., Donova, M.V. Reconstruction of the steroid 1(2)-dehydrogenation system from *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D in *Mycolicibacterium* hosts. *Microorganisms*. 11, 2720 (2023) https://doi.org/10.3390/microorganisms11112720
7. Fernández-Cabezón, L., Galan, B., García, J.L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production. 10, *Microb Biotechnol*. 151-161 (2017) https://doi.org/10.1111/1751-7915.12433
8. Gerber, A., Milhim, M., Hartz, P., Zapp, J., Bernhardt, R. Genetic engineering of *Bacillus megaterium* for high-yield production of the major teleost progestogens 17α,20β-di- and 17α,20β,21α-trihydroxy-4-pregnen-3-one. *Metab Eng*. 36, 19-27. (2016) https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.02.010
9. Doden, H.L., Pollet, R.M., Mythen, S.M., Wawrzak, Z., Devendran, S., Cann, I., Koropatkin, N.M., Ridlon, J.M. Structural and biochemical characterization of 20β-hydroxysteroid dehydrogenase from *Bifidobacterium adolescentis* strain L2-32. *J Biol Chem*. 294, 12040-12053 (2019) https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009390
10. Devendran, S., Méndez-García, C., Ridlon, J.M. Identification and characterization of a 20β-HSDH from the anaerobic gut bacterium *Butyricicoccus desmolans* ATCC 43058. *J Lipid Res*. 58, 916-925 (2017) https://doi.org/10.1194/jlr.M074914.

Бактериальная деструкция монохлорированных бифенилов в присутствии легко доступного источника углерода на примере штамма *Rhodococcus* sp. FG1

Королев Н.А., Кирьянова Т.Д., Егорова Д.О.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН
daryao@rambler.ru

Ключевые слова: *Rhodococcus*, ПХБ, глюкоза, деструкция.

Ремедиация загрязненных территорий с использованием биодеградативного потенциала бактериальной микрофлоры является в настоящее время одним из наиболее перспективных подходов для решения экологических проблем. Одним из ограничений для реализации технологий, основанных на использовании бактерий-деструкторов, является наличие в природной среде соединений углерода, более доступных для ферментативных систем бактерий, чем поллютанты. В связи с этим актуальным является поиск штаммов, способных разлагать экозагрязнители в присутствии легкодоступных источников углерода.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) относятся к группе Стойких органических загрязнителей (СОЗ) и подлежат уничтожению. Однако на данный момент спектр территорий, в абиотических и биотических объектах которых детектируются ПХБ чрезвычайно широк (Negrete-Bolagay et al., 2021). Основным способом очистки природных сред от ПХБ является биоремедиация с использованием аэробных бактерий (Valizadeh et al., 2021).

Цель работы – изучить способность штамма *Rhodococcus* sp. FG1 осуществлять деструкцию монохлорированных бифенилов в присутствии в среде глюкозы.

В работе использован штамм *Rhodococcus* sp. FG1 (ВКМ Ac-3030), выделенный из почв, длительно загрязненных хлорорганическими соединениям группы Стойкие органические загрязнители. Деструкцию монохлорированных бифенилов (ПХБ 1, ПХБ 2, ПХБ 3) (0,1 г/л) осуществляли в экспериментах с «отмытыми» клетками как описано (Egorova et al., 2020), с внесением раствора глюкозы до конечной концентрации 0,1 г/л. Рост культуры контролировали измерением оптической плотности (спектрофотометр UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{макс}$=600 нм. Анализ монохлорбифенилов осуществляли методом ГХ-МС на хроматографе «Agilent GC 7890A MSD 5975C inert XL EI/CI» («Agilent Technology», США) согласно (Egorova et al., 2020). Наличие хлорбензойных кислот фиксировали методом ВЭЖХ на LC-20A («Shimadzu», Япония) с колонкой DiKMA C18 (250 x 4,6 мм) («Dikma Technology Inc», Канада) и УФ-детектором при 205 нм.

В результате проведённого исследования установлено, что за 24 ч инкубации культуры штамма FG1 в минеральной среде с глюкозой и одним из конгенеров монохлорбифенилов, оптическая плотность культуры увеличивалась в 1,5–2,2 раза. В среде зафиксировано присутствие хлорбензойных кислот, как основного метаболита монохлорбифенилов, при этом ПХБ 1, ПХБ 2 и ПХБ 3 через 24 ч культивирования в среде не детектировались.

Таким образом, штамм *Rhodococcus* sp. FG1 осуществляет разложение монохлорированных бифенилов даже при наличии в среде более доступного источника углерода.

Работа выполнена при поддержке РНФ грант № 24-24-00498.

Список литературы:

Egorova, D.O., Gorbunova, T.I., Pervova, M.G., Kir'yanova, T.D., Demakov, V.A., Saloutin, V.I., and Chupakhin, O.N. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains, *J. Haz. Mat*., 2020, vol. 400, article 123328. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123328

Negrete-Bolagay, D., Zamora-Ledezma, C., Chuya-Sumba, C., De Sousa, F.B., Whitehead, D., Alexis, F., and Guerrero, V.H. Persistent organic pollutants: The trade-off between potential risks and sustainable remediation methods, *J. Environ. Managem*., 2021, vol. 300, article 113737. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113737.

Valizadeh, S., Lee, S.S., Baek, K., Choi, Y.J., Jeon, B.H., Rhee, G.H., Andrew Lin, K.Y., and Park, Y.K. Bioremediation strategies with biochar for polychlorinated biphenyls (PCBs)-contaminated soils: A review, *Environ. Res*., 2021, vol. 200, article 111757. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111757.

Влияние комплексного загрязнения почвы на рост и физиологическое состояние ячменя

Кульбаева Л.А[1]., Кузина Е.В[2]., Рафикова Г.Ф[2]., Мухаматдьярова С.Р[2]., Искужина М.Г[2]., Коршунова Т.Ю[2].

[1]ФГБОУ ВО Уфимский университет науки и технологий, Уфа
[2]Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа
lab.biotech@yandex.ru

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, тяжелые металлы, засоление почв, малоновый диальдегид, хлорофилл.

Загрязнение почвы представляет серьезную экологическую проблему, которая оказывает комплексное воздействие на рост и развитие сельскохозяйственных растений. Изучение влияния различных видов загрязнения почвы на зерновые культуры помогает выявить механизмы устойчивости данных растений и пути повышения их продуктивности в неблагоприятных условиях. Цель работы: выявление морфофизиологических изменений в растениях ячменя при полизагрязнении почвы (нефть + хлорид натрия, нефть + кадмий, нефть + свинец) и оценка эффективности бактеризации для повышения адаптивности растений к одновременному присутствию нескольких поллютантов.

Для загрязнения почвы использовали растворы Cd^{2+} (15 мг/кг) и Pb^{2+} (960 мг/кг), NaCl – 0,25% масс, нефть – 1,5% масс. В определенные варианты добавляли 50 мл разбавленной культуральной жидкости PGP-штаммов *P. hunanensis* IB C7 и *P. alcoligenes* UOM 10 (10^6 КОЕ/мл). В стаканы помещали по 6 проростков ячменя сорта Челябинский 99. Через 14 суток измеряли уровень малонового диальдегида (МДА) спектрометрически по методу Коста [1] и суммарного хлорофилла (*a*+*b*) измеряли с помощью прибора DUALEX SCIENTIFIC+ согласно рекомендациям производителя. Растения выращивали 21 сутки при 22-24°C в условиях светоплощадки. В конце оценивали сухую массу побегов и корней.

В результате загрязнения почвы хлоридом натрия и тяжелыми металлами (ТМ) сухая масса корней и побегов ячменя выросла на 82,2-109,3% и 24,9-50,6% соответственно. Загрязнение почвы нефтью не повлияло на сухую массу корней, но в 2 раза уменьшило массу побегов. Внесение хлорида натрия оказало положительное влияние на формирование побегов ячменя, растущего в присутствии нефти, сухая масса растений увеличилась на 28,5%. Комплексное загрязнение почвы нефтью и NaCl, нефтью и ТМ не препятствовало росту корней растений, напротив при сочетанном загрязнении сухая масса корней была выше, чем в варианте только с нефтью или в чистой почве. Штаммы бактерий оказывали стимулирующее воздействие на развитие растений только при контаминации почвы нефтяными углеводородами отмечено увеличение сухой массы как подземной, так и надземной частей ячменя на 23,0-23,2 и 33,6-40,9% соответственно.

МДА – цитотоксический продукт окисления липидов, отражающий степень окислительного стресса в тканях [2]. Загрязнение почвы нефтью, хлоридом натрия и ТМ способствовало увеличению МДА в растениях (рис.1), в большей степени в варианте со свинцом (на 48,9%). Внесение в нефтезагрязненную почву дополнительных поллютантов не вызывало увеличение данного показателя. Интродукция бактерий повышала устойчивость растений к токсическому действию ионов свинца, как в отсутствии нефти, так и при загрязнении почвы углеводородами на 14,5-19,2%.

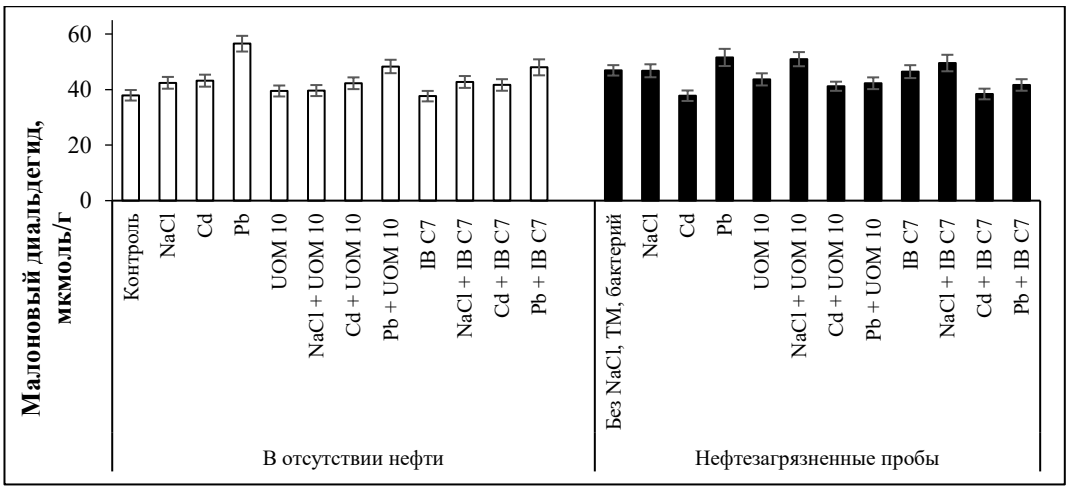


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида в листьях растений ячменя через 14 суток после посева Загрязнение почвы нефтью уменьшало количество хлорофилла в листьях ячменя на 24,3% (рис.2).

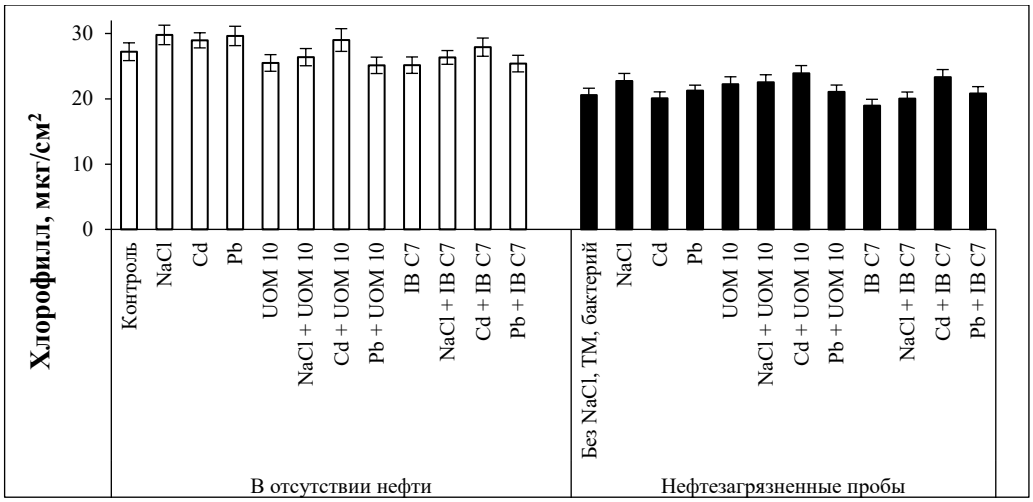


Рис. 2. Суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях растений ячменя через 14 суток после посева.

В присутствии хлорида натрия и ТМ суммарное содержание хлорофиллов a и b осталось таким же как в контрольном варианте. При смешанном загрязнении (нефть совместно с NaCl либо с ТМ) синтез данных пигментов в растениях сохранился на том же уровне, который был зафиксирован в варианте с нефтью. Внесение в почву PGP-бактерий на биосинтез хлорофилла не повлияло.

Результаты показали, что умеренное загрязнение почвы NaCl, ацетатом кадмия или ацетатом свинца стимулирует рост корней и побегов ячменя, тогда как нефть влияет негативно, особенно на массу побегов. Все загрязнения повышают уровень МДА. Бактеризация штаммами *P. hunanensis* IB C7 и *P. alcoligenes* UOM 10 значительно повышает устойчивость ячменя к токсичному воздействию поллютантов, что важно для биоремедиации и улучшения агротехнических практик на загрязненных почвах.

Список литературы:

1. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // Plant Sci. 2002. Vol. 162. P. 939–945. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00051-1

2. Li D., Wang L., Wang Y., Li H., Chen G. Soil properties and cultivars determine heavy metal accumulation in rice grain and cultivars respond differently to Cd stress // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. Vol. 26. P. 14638-14648. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04727-9.

Характеристика биоконтрольного потенциала штамма *Bacillus subtilis* IV3 с нарушенной экспрессией гена сурфактина

Ласточкина Е.Э., Волкова Е.С., Васильева Ю.А., Рудакова Н.Л.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
lelya_lastochkina@bk.ru

Ключевые слова: PGPR-штамм, *Bacillus subtilis,* сурфактин, CRISPR/Cas9, антагонистическая активность, *Fusarium tricinctum.*

В настоящее время PGPR-штаммы широко используются и изучаются как потенциальные средства биоконтроля в сельском хозяйстве. Одними из самых известных представителей этой группы являются бактерии рода *Bacillus.* Они проявляют выраженную биологическую активность, направленную на защиту и стимуляцию роста растений. Внося существенный вклад в функционирование агроэкосистем, они способствуют увеличению продуктивности и стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур. Важнейшими составляющими их механизма действия являются: синтез сидерофоров и фитогормонов (ИУК), антагонизм по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, а также успешная колонизация корневой системы, обеспечиваемая, в том числе, формированием биопленок. Одним из биологически активных веществ, продуцируемых *Bacillus subtilis* также является сурфактин. Он представляет собой биосурфактан и способствует развитию таких механизмов взаимодействия микроорганизмов с растениями, как антибиоз, конкуренция и индуцированная системная устойчивость [1].

Целью работы было оценить влияние инактивации гена сурфактина на ростовые характеристики и антагонистическую активность штамма *B. subtilis* IV3 в отношении фитопатогена *F. tricinctum*. Для этого методом CRISPR/Cas9 редактирования генома был получен мутант *B. subtilis* IV3 Δ*srf*A с удаленным ключевым геном биосинтеза сурфактина. Для обоих штаммов была исследована динамика роста на жидкой среде LB при 37 °C с аэрацией в течении 80 часов. Пробы отбирались через каждые 2 часа. Рост культуры контролировали по изменению оптической плотности (OD590).

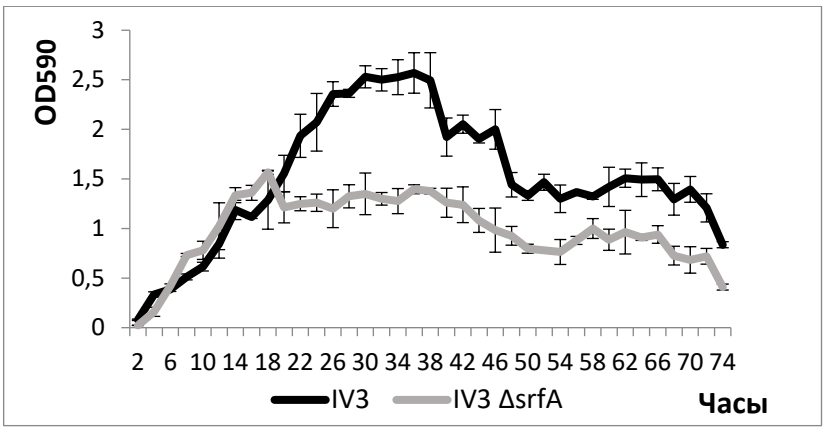


Рис. 1 Динамика роста нативного штамма *B. subtilis* IV3 и мутантного штамма с инактивированным геном Δ*srf*A

Сравнение динамики роста штаммов *B. subtilis* IV3 и *B. subtilis* IV3Δ*srf*A показало статистически значимое снижение роста мутантного штамма (более 60 %) по сравнению с диким типом (рис. 1). До 18-го часа кривые роста обоих штаммов не отличаются, далее мутантный штамм переходит к стационарной фазе, а дикий тип продолжает набор биомассы с замедлением роста после 30-го часа (рис. 1). При этом к 72 часу роста снижение оптической плотности культуры относительно собственного максимума для дикого типа составляет 45,5%, в то время как для

мутанта 54%. Таким образом, с потерей гена сурфактина штамм медленнее набирает биомассу, быстрее выходит на стационар и значительно быстрее отмирает.

Также была оценена антагонистическая активность штаммов *B. subtilis* IV3 по отношению к значимому фитопатогенному микромицету *Fusarium tricinctum* модифицированным методом агаровых блоков на протяжении 7 суток. В результате исследования обнаружено, что ризосферный штамм *B. subtilis* IV3 подавляет рост *F. tricinctum* на 67,5 %. В то время как у мутантного штамма антагонистическая активность против *F. tricinctum* пропадает. Полученные результаты могут быть, предположительно, объяснены отсутствием у мутантного штамма выработки сурфактина, широко известного своими антифунгальными свойствами. Кроме того, Gestel et al. отмечают, что ген *srf*A также необходим для эффективного скольжения, и предположили, что роль сурфактина заключается в уменьшении поверхностного трения [2,3]. Поэтому снижение биоконтрольных свойств по отношению к *F. tricinctum* у мутантного штамма может наблюдаться в связи с нарушением данных функций.

Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено, что потеря гена сурфактина снижает биомассу *B. subtilis* IV3 Δ*srf*A, а также приводит к отсутствию у штамма антагонистических свойств по отношению к *F. tricinctum.* В дальнейшем для установления механизма действия гена *srf*A планируется оценить влияние штамма на ростостимулирующие показатели сельскохозяйственных культур.

РНФ №22-16-00138.

Список литературы:

[1] D.P. Sachdev, S.S. Cameotra, “Biosurfactants in agriculture,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, no. 3, pp. 1005-1016, Jan. 2013, doi:10.1007/s00253-012-4641-8

[2] J. Van Gestel, H. Vlamakis, R. Kolter, “From Cell Differentiation to Cell Collectives: Bacillus subtilis Uses Division of Labor to Migrate.” *PLoS Biol.* vol. 20, no. 4, Apr 2015 doi: 10.1371/journal.pbio.1002141.

[3] A. Rosier, “Surfactin and Spo0A-Dependent Antagonism by *Bacillus subtilis* Strain UD1022 against *Medicago sativa* Phytopathogens”, *Plants (Basel)* vol. 12, no. 5, pp. 1007, Feb 2023, doi: 10.3390/plants12051007. PMID: 36903868; PMCID: PMC10005099.

Биоконверсия литохолевой и хенодезоксихолевой кислот штаммами рода *Rhodococcus*

Лобастова Т.Г.[1], Николаева В.М.[1], Казанцев А.В.[2], Донова М.В.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2]ФГБГОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»
Химический факультет, Москва
lobastova_t@rambler.ru

Ключевые слова: желчные кислоты, *Rhodococcus*, биоконверсия.

Желчные кислоты – поверхностно-активные соединения, имеющие в своем составе С5-боковую цепь в виде остатка кислоты и одну или несколько гидроксильных групп. Желчные кислоты встречаются в пищеварительном тракте позвоночных и выполняют важную физиологическую функцию – эмульгирование липидов, способствуя перевариванию гидрофобных питательных веществ. Природным источником желчных кислот являются экскременты животных и человека, а также сточные воды фармацевтических и сельскохозяйственных предприятий. Основной вклад в биоразложение желчных кислот до углекислого газа и воды вносят бактерии, обладающие ферментами катаболизма желчных кислот. Исследования, посвященные деградации холевой кислоты протеобактериями (Feller et al., 2021), доминируют в литературе. Ранее нами была изучена конверсия дезоксихолевой и холевой кислот штаммами рода *Rhodococcus* (Deshcherevskaya et al, 2016). К настоящему моменту доступно мало сведений о метаболизме других желчных кислот представителями рода *Rhodococcus*.

Целью работы являлось изучение биокаталитического потенциала штаммов рода *Rhodococcus* в отношении ЛХК (3α-гидрокси-5β-холан-24-овой кислоты) и ХДХК (3α,7α-дигидрокси-5β-холан-24-овой кислоты), а также определение структуры продуктов трансформации.

Культивирование штаммов рода *Rhodococcus* проводили на среде, как описано ранее (Deshcherevskaya et al, 2016). Конверсию литохолевой (ЛХК) и хенодезоксихолевой кислот (ХДХК) (2.5 мМ) проводили в 10 мл минеральной среды с глицерином и дрожжевым экстрактом в концентрации 10 г/л. Субстраты вносили в виде метанольного раствора. Анализ продуктов биоконверсии проводили методом ТСХ, идентификацию ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР спектроскопией.

Исследование конверсии ЛХК (2.5 мМ) 17 штаммами рода *Rhodococcus* показало, что только пять штаммов: *Rhodococcus* sp. SIMT-105, *Rhodococcus* sp. ВКМ Ac-1148, *Rhodococcus* sp. ВКМ Ac-1153, *Rh. erythropolis* ВКМ Ac-1152 и *Rh. ruber* ВКМ Ac-1021 были не способны полностью трансформировать субстрат за 144 часа (таблица 1). Часть штаммов формировала 3-оксохол-4-ен-24-овую кислоту из ЛХК (рис. 1А).

Тестирование исследуемых штаммов рода *Rhodococcus* в отношении ХДХК (2.5 мМ) показало, что большинство штаммов было неспособно полностью трансформировать субстрат за 144 часа конверсии (таблица 1). Штаммы формировали, в основном, 3-кето-5β-холан-24-овую кислоту (3-кето-ХДХК) из экзогенного субстрата, но выход этого продукта был незначительным (рис. 1Б). Исключением являлся штамм *Rhodococcus* sp. SIMT-105, который накапливал 3-кето-ХДХК в значительных количествах: до 50-60%. Среди продуктов трансформации наблюдали также соединения с 3-кето-4-ен-структурой в следовых количествах.

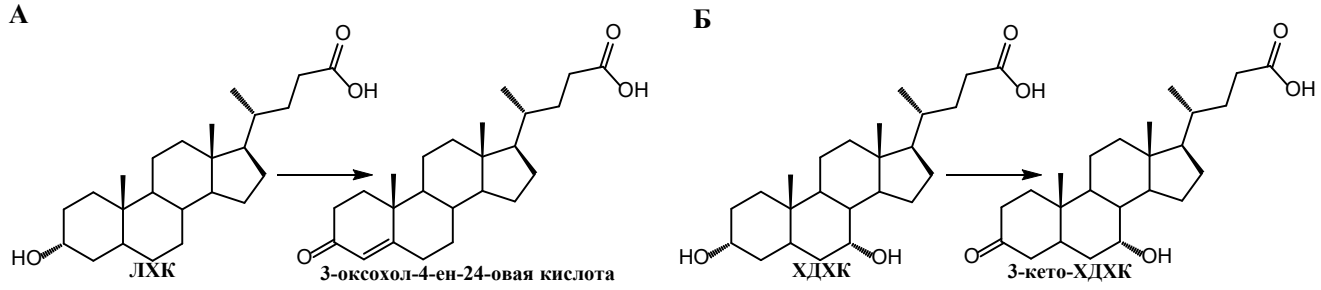


Рис.1. Основные продукты трансформации ЛХК и ХДХК штаммами рода *Rhodococcus*.
Табл. 1. Биоконверсия желчных кислот: ЛХК и ХДХК штаммами рода *Rhodococcus*.

	Штамм	Остаточное содержание, %			
		ЛХК[1]	Время, ч	ХДХК[2]	Время, ч
1	*Rhodococcus* sp. MTS-77	0	144	71.9	144
2	*Rhodococcus* sp. SIMT-105	21.2	144	<1.0	24-48
3	*Rhodococcus* sp. MTOC-850	0	48	61.2	144
4	*Rhodococcus* sp. ВКМ Ac-857	0	48	39.6	144
5	*Rhodococcus* sp. ВКМ Ac-1148	33.6	144	96.0	144
6	*Rhodococcus* sp. ВКМ Ac-1153	24.0	144	76.8	144
7	*Rhodococcus coprophilus* ВКМ Ac-571	0	48	86.4	144
8	*Rhodococcus corynebacterioides* ВКМ Ac-870	0	24	<1.0	96
9	*Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-1150	0	24	85.2	144
10	*Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-1152	6.0	144	80.4	144
11	*Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-1161	0	48	85.2	144
12	*Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-1164	0	48	0	24
13	*Rhodococcus rhodochrous* ВКМ Ac-860	0	48	74.4	144
14	*Rhodococcus rhodochrous* ВКМ Ac-1227	0	24	34.8	48
15	*Rhodococcus rhodochrous* ВКМ Ac-1282	0	144	31.2	144
16	*Rhodococcus ruber* ВКМ Ac-1021	18.0	144	48.0	144
17	*Rhodococcus ruber* ВКМ Ac-1167	0	96	61.2	144

1 - внесение субстрата на 0 ч роста в трансформационную среду;
2 - внесение субстрата после 24-х часов роста в трансформационную среду

Таким образом, штаммы рода *Rhodococcus* способны трансформировать ЛХК и ХДХК. Дополнительная 7α-гидроксигруппа в структуре ХДХК негативно влияла на ферментативную активность большинства исследуемых штаммов. Степень конверсии ХДХК была низкой по сравнению ЛХК. Основным продуктом трансформации ХДХК штаммами рода *Rhodococcus* являлась 3-кето-ХДХК. Наличие в среде биоконверсии ЛХК и ХДХК 3-кето-4-ен-соединений свидетельствует о функционировании 9,10-*секо*-пути катаболизма желчных кислот в клетках изучаемых штаммов рода *Rhodococcus*.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 122040500054-3.

Список литературы:

1. Feller F.M., Holert J., Yücel O., Philipp B. Microorganisms, 2021, 9, 1759. DOI:10.3390/microorganisms9081759
2. Deshcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Kollerov V.V., Kazantsev A.V., Donova M.V. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatyc, 2016, V. 133, S157-S165.

Исследование антагонистической активности ризосферного штамма *Bacillus velezensis* IV1 в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Мамчур А.А., Волкова Е.С., Васильева Ю.А., Ласточкина Е.Э., Шарипова М.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет
alexandramamchur5250@gmail.com

Ключевые слова: биозащитный потенциал, ризосферный изолят, *Bacillus velezensis*, PGPR, фитопатогенные бактерии, биоинформатический анализ, антагонистическая активность.

Представители рода *Bacillus* известны повсеместной распространенностью, многообразием метаболических путей и активным участием во внутри- и межвидовых отношениях внутри различных биоценозов. Ризосферные штаммы зарекомендовали себя как эффективные биологические агенты с выраженными биоконтрольными свойствами, благодаря чему они представляют собой экологическую альтернативу химическим удобрениям и пестицидам. Колонизируя корневые структуры, бациллы образуют фитопротекторные биопленки, в которых осуществляется синтез и транспорт макроэлементов, антибиотиков, антиоксидантов и фитогормонов. Таким образом, широкий спектр синтезируемых ими вторичных метаболитов позволяет ингибировать рост фитопатогенных микроорганизмов и также способствует повышению устойчивости культурных сортов растений к неблагоприятным условиям среды. Однако, в литературе отмечается высокая степень вариативности между видами *Bacillus* в проявлении отдельных PGPR-свойств (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), что имеет наибольшее значение в разработке новых пробиотических препаратов на основе сбалансированных бактериальных консорциумов. Целью настоящей работы является определение фитопротекторного потенциала ризосферного штамма *Bacillus velezensis* IV1 в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

Почвенный изолят *Bacillus* sp. был получен в чистой культуре из ризосферы *Solanum tuberosum.* Полногеномное секвенирование выполняли на платформе Illumina NovaSeq 6000. Библиотеки готовили из выделенной ДНК с использованием коммерческих наборов. Идентификацию видовой принадлежности штамма проводили с помощью BLASTn по генам 16s рРНК, gyrA и gyrB. Наиболее точный результат дало сравнение по гену gyrB, благодаря чему изолят IV1 был идентифицирован как штамм *B. velezensis* с идентичностью 100%. С помощью программы antiSMASH был проведен дальнейший биоинформатический анализ, выявивший в геноме *B. velezensis* IV1 последовательности генов вторичных метаболитов, обуславливающих антагонистические свойства штамма. Были обнаружены кластеры полиеновых, рибосомальных и нерибосомальных антибиотиков, таких как микосубтилин, макролактин H, бациллаен, амилоциклицин, бацилизин, что коррелирует с аналогичными исследованиями и характерны для вида *B. velezensis* [1]. Наибольшее значение в проявлении фитопротекторных свойств имеют сурфактин - поверхностно-активный липополипептид антифунгицидного действия, участвующий в сигнализации quorum sensing [2], и сидерофор катехолового типа - бациллибактин, который обеспечивает конкурентное преимущество бацилл над микромицетами за счёт хелатирования нерастворимых форм железа [3].

Оценка антагонистической активности ризосферного изолята *B. velezensis* IV1 проводилась против ряда значимых фитопатогенных микромицетов методом агаровых блоков в течение 7 суток. В результате исследования было обнаружено, что *B. velezensis* IV1 эффективно ингибировал рост *Fusarium oxysporum* DR40 на 69%, *F. tricinctum* на 61%, *Alternaria* sp. на 58% и *R. solani* на 26,6%. Исследование антагонистической активности по отношению к фитопатогенным бактериальным штаммам *Xanthomonas* sp. и *Pectobacterium* sp. проводили на среде КГА. По результатам совместного культивирования ризосферный изолят *B. velezensis* IV1 образовывал зоны подавления роста равные 2,75±0,6 см и 2,16±0,3 см, соответственно.

Таким образом, изолят *B. velezensis* IV1 обладает значительным биозащитным потенциалом для ризосферных сообществ за счет высокой ингибирующей способности в отношении фитопатогенных микромицетов. Полученные результаты позволяют рассматривать полученный штамм в качестве фитопротекторного кандидата для сельскохозяйственных культур.

РНФ №25-16-00143.

Список литературы:

[1] Zaid, D. S. Comparative Genome Analysis Reveals Phylogenetic Identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and Genomic Insights into Its Plant Growth Promotion and Biocontrol Effects [Text] / D. S. Zaid, S. Cai, C. Hu, Z. Li, Y. Li // Microbiol Spectr. – 2022. – V.10, №1. – P.e0216921.

[2] Singh, P. Mechanistic insights and potential use of siderophores producing microbes in rhizosphere for mitigation of stress in plants grown in degraded land [Text] / P. Singh, P. K. Chauhan, S. K. Upadhyay, R. K. Singh, P. Dwivedi, J. Wang, D. Jain, M. Jiang // Frontiers in Microbiology. – 2022. – T. 13. – C. 898979.

[3] Liu, N. Cations and surfactin serving as signal molecules trigger quorum sensing in *Bacillus amyloliquefaciens* [Text] / N. Liu, B. Chen, X. Zhao, J. Wen, G. Qi // J Basic Microbiol. – 2022. – V.62, №1. – P.35-47.

Варианты путей конверсии малата в оксалоацетат в цикле Кребса

Минкевич И.Г.

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

Ключевые слова: цикл Кребса, малатдегидрогеназа, NADH, $FADH_2$, константа равновесия.

Оксалоацетат является метаболитом цикла Кребса, который принимает на себя входящий поток вещества в форме Acetyl~CoA и образует цитрат как начальное соединение для дальнейшего многоступенчатого окисления. В этом отношении оксалоацетат является ключевым метаболитом цикла Кребса.

Считается, что образование оксалоацетата из малата, как правило, происходит при участии NAD-зависимой малатдегидрогеназы (MDH, EC 1.1.1.37) по схеме:

$$\text{L-Malate}^{2-} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Oxaloacetate}^{2-} + \text{NADH} + \text{H}^+. \quad (1)$$

Известно также, что эта реакция, если она идёт в сторону образования оксалоацетата, приводит к увеличению стандартной свободной энергии на 29.7 кДж/моль. Это соответствует значению константы равновесия, равному 6.3×10^{-6}. Следовательно, реакция является необратимой и должна проходить в противоположном направлении. С другой стороны, конверсия малата в оксалоацетат должна происходить, чтобы цикл Кребса работал.

Самые авторитетные источники (например, Buchanan et al, 2015;Nelson, Cox, 2008; Nelson et al., 2022) объясняют работу NAD-зависимой малатдегидрогеназы в нужном для цикла Кребса направлении тем, что, как они полагают, следующая реакция (цитратсинтаза) работает так быстро, что оксалоацетат в ней мгновенно потребляется, несмотря на свою крайне низкую концентрацию.

Нами проанализирована обоснованность этого утверждения. Показано, что при надлежащей скорости работы всего цикла крайне низкое значение концентрации оксалоацетата возможно только, если бы константа насыщения цитратсинтазы по оксалоацетату была бы по порядку величины в $10^4 \div 10^6$ раз меньше аналогичного параметра малатдегидрогеназы. Это представляется маловероятным. К тому же, подобная ситуация могла бы быть допущена и для других необратимых реакций, вследствие чего все реакции в метаболизме оказались бы обратимыми. Поэтому вышеприведенное кинетическое объяснение работы NAD-зависимой малатдегидрогеназы в нужном для цикла Кребса направлении следует рассматривать как некорректное.

Возможны следующие реалистичные варианты конверсии малата в оксалоацетат.

1. Этот процесс может проходить в две стадии, осуществляемые сначала NAD-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназой (EC 1.1.1.39):

$$\text{Malate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+,$$

а затем пируваткарбоксилазой (EC 6.4.1.1):

$$\text{Pyruvate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} \rightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i.$$

Направление этих реально проходящих реакций соответствует тому, которое указано на вышеприведенных схемах. Складывая эти уравнения, получаем:

$$\text{Malate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} \rightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{ADP} + \text{P}_i. \quad (2)$$

Общий баланс реакции (2) такой же, как у реакции (1) за исключением того, что она требует затраты ATP. Это изменяет баланс свободной энергии и сдвигает равновесие процесса в нужную сторону. Схема модифицированного таким образом цикла Кребса дана ниже.

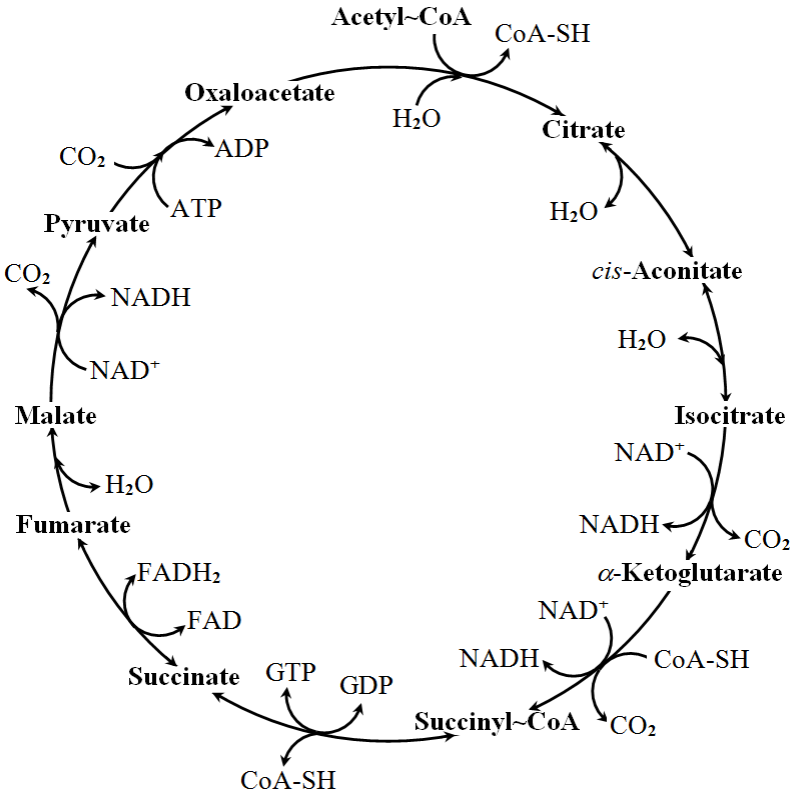
2. Конверсия малата в оксалоацетат может осуществляться FAD-зависимой малатдегидрогеназой:

$$\text{L-Malate}^{2-} + \text{FAD} \rightarrow \text{Oxaloacetate}^{2-} + \text{FADH}_2 \quad (3)$$

Проведенный нами расчёт баланса свободной энергии этой реакции показывает, что она должна проходить именно в том направлении, как указано на схеме (3). В литературе существует ряд публикаций экспериментальных данных, указывающих на существование этого фермента. FAD-зависимая малатдегидрогеназа получила в литературе название Malate:quinone oxidoreductase (MQO), поскольку $FADH_2$ передаёт далее восстановленность на убихинон. Поскольку $FADH_2$ передаёт восстановленность в электрон-транспортную цепь в обход комплекса I, этот вариант

образования оксалоацетата также энергетически менее выгоден, чем схема (1), но зато он реалистичен.

3. Не следует исключать возможность прямого участия ATP в реакции (1), которое до сих пор не обнаружено. Затрата одной молекулы ATP, если бы она имела место, сделала бы реальным направление реакции EC 1.1.1.37, указанное на схеме (1).



Вариант цикла Кребса с двухстадийным превращением малата в оксалоацетат

Список литературы:

Buchanan B.B., Gruissem W., and Jones. R.L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd Ed. (Chichester. Wiley-Blackwell. 2015).

Nelson D.L., and Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry 5 ed. (NY. W.H.Freemaann & Co. 2008). ISBN-139: 78-0-7167-7108-1, ISBN-I 0: 0-7 167 -7 r08-X.

Nelson D.L., Cox M.M., and Hoskins A.A. Lehninger Principles of Biochemistry 8 ed. (NY. Macmillan Learning. 2022). ISBN-13: 978-1-319-32234-2.

Сравнительная характеристика штаммов *Aneurinibacillus migulanus* – продуцентов пептидного антибиотика грамицидина S

Мнеян М.А.

РТУ МИРЭА, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва
melina.mneyan@bk.ru

Ключевые слова: грамицидин S, *Aneurinibacillus migulanus*, бактериальная диссоциация.

Грамицидин S — циклический декапептид, который с 1944 года используется в качестве антибиотика местного применения. Пептид обладает широким спектром антимикробного действия, включая активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. В последнее время интерес к антимикробным пептидам возрождается, так как они активны против бактериальных биопленок и к ним редко вырабатывается резистентность. Грамицидин S синтезируется бактерией *Aneurinibacillus migulanus*, которая склонна к диссоциации при культивировании и хранении.

Бактериальная диссоциация — явление, при котором популяция бактерий разделяется на генетически идентичные варианты с различными морфологическими, культуральными и биологическими свойствами. Это происходит под влиянием внешних факторов и проявляется в виде появления разных типов колоний, например, гладких (S-формы) и шероховатых (R-формы). Известно, что не все формы *A. migulanus* синтезируют антибиотик и при выборе штамма-продуцента важно отбирать продуктивные и стабильные варианты.

В настоящей работе исследовали стабильность и продуктивность по грамицидину S трех штаммов *A. migulanus* с целью выделения перспективного штамма-продуцента. Использовали штаммы бактерии *Aneurinibacillus migulanus (ранее Brevibacillus brevis)* var. G.-B. R-форма (ВКПМ B-1542), *A. migulanus* var. G.-B. S-форма (ВКПМ B-1543) и мутантный штамм *A. migulanus* var. G.-B 46, полученный из S-формы. Бактерии выращивали в среде следующего состава: соевый пептон – 16 г/л, дрожжевой экстракт – 10 г/л, хлорид натрия – 5 г/л, орнитин – 10 г/л при 40 ºС 48 ч. Грамицидин S экстрагировали из бактериальной биомассы экстракцией этанолом. Антимикробную активность экстрактов биомассы определяли методом диффузии агар из лунок против *Micrococcus luteus*. Экстракты биомассы анализировали методом спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе бутанол-1 : метанол : уксусная кислота : вода = 100:40:40:24, пятна обнаруживали 0,2 % нингидрином в ацетоне.

На первом этапе работы оценивали диссоциацию штаммов. Для этого проводили культивирование штаммов 48 ч и трижды последовательно пересевали в свежую среду. Исходно все штаммы были морфологически однородны, но в конце культивирования штаммы R и 46 образовывали 2 типа колоний, штамм S – 3 типа.

Из литературных данных [1] известно, что при культивировании в богатой среде YP (пептон – 50 г/л, дрожжевой экстракт – 50 г/л) происходит обогащение культуры *A. migulanus* продуктивными фенотипическими формами. После культивирования в данной среде штаммы R и S были однородны, а штамм 46 образовывал два типа колоний, причем один из них практически не проявлял антимикробной активности. Выделенные формы штаммов R и S сохраняли стабильную морфологию и продуктивность при многократных пересевах.

Список литературы

1.Berditsch M., Afonin S., Ulrich A. S. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation //Applied and environmental microbiology. – 2007. – Т. 73. – №. 20. – С. 6620-6628.

Выделение винка-алкалоидов из растения Catharanthus roseus и их применение в фармацевтической отрасли

Норкозиева Озода

Мирзо Улугбека Национального университета Узбекистана
norqoziyevaozoda9@gmail.com

Аннотация: Растение Catharanthus roseus (катарантус) относится к семейству Apocynaceae и содержит фармакологически важные винка-алкалоиды — такие как винбластин, винкристин, винорельбин и виндесин. Эти соединения являются одними из наиболее значимых природных противораковых веществ. Основным источником данных алкалоидов служит Catharanthus roseus, произрастающий в тропических и субтропических регионах.

Ключевые слова: Catharanthus roseus, винка-алкалоиды, винбластин, винкристин, экстракция, противораковые вещества, фармацевтика.

Annotatsiya: Catharanthus roseus (katarantus) o‘simligi Apocynaceae oilasiga mansub bo‘lib, tarkibida farmakologik jihatdan muhim bo‘lgan vinka alkaloidlari — vinblastin, vinkristin, vinorelbin va vindesin kabi birikmalar mavjud. Ushbu moddalarning barchasi tabiiy manbadan olinadigan eng muhim antikarsinogen (saraton kasalligiga qarshi) birikmalardan hisoblanadi. Bu alkaloidlarning asosiy manbai tropik va subtropik hududlarda o‘suvchi Catharanthus roseus o‘simligidir.

Kalit so‘zlar: Catharanthus roseus, vinka alkaloidlari, vinblastin, vinkristin, ekstraksiya, antikarsinogen moddalar, farmatsevtika.

Annotation: The plant Catharanthus roseus (Madagascar periwinkle) belongs to the Apocynaceae family and contains pharmacologically important vinca alkaloids such as vinblastine, vincristine, vinorelbine, and vindesine. These compounds are among the most significant natural anticancer substances. The main source of these alkaloids is Catharanthus roseus, which grows in tropical and subtropical regions.

Keywords: Catharanthus roseus, vinca alkaloids, vinblastine, vincristine, extraction, anticancer substances, pharmaceuticals.

Введение.

Растение Catharanthus roseus (катарантус розовый) относится к семейству Apocynaceae и является важным источником биологически активных веществ, в частности винка-алкалоидов — винбластина, винкристина, винорельбина и виндесина.Эти природные соединения обладают выраженной противоопухолевой активностью и широко применяются в современной фармацевтической промышленности для лечения различных видов рака, включая лейкемию, лимфому, рак молочной железы и лёгких.

Интерес к Catharanthus roseus в последние десятилетия значительно возрос, так как данное растение является не только ценным объектом фитохимических исследований, но и перспективным сырьём для получения новых лекарственных средств. Изучение способов выделения и очистки винка-алкалоидов имеет большое практическое значение, поскольку эффективность этих веществ напрямую зависит от метода их экстракции и степени чистоты. Актуальность темы определяется необходимостью совершенствования ехнологий извлечения алкалоидов из растительного сырья, а также поиском более экономичных и экологически безопасных способов их получения. Кроме того, исследование фармакологических свойств винка-алкалоидов способствует развитию отечественной фармацевтической отрасли и созданию новых противоопухолевых препаратов на растительной основе.Современные методы выделения винка-алкалоидов основаны на сочетании экстракционных и хроматографических технологий, что позволяет повысить выход и чистоту конечного продукта. Несмотря на сложность биосинтеза этих соединений в растении, научные исследования направлены на оптимизацию агротехнических и биотехнологических условий для увеличения содержания алкалоидов в сырье.Кроме того, изучение Catharanthus roseus имеет важное значение не только для фармацевтики, но и для биотехнологии, так как данный вид может служить модельным объектом для исследования вторичного метаболизма растений. Использование клеточных культур катарантуса открывает новые возможности для промышленного производства противоопухолевых препаратов растительного происхождения.

Список литературы:

1. Ахмедов, Д.А. Фармакогнозия. – Ташкент: Издательство “Медицина”, 2019.-352 с

2. Пирузян, Л.А. Лекарственные растения и их применение в медицине. – Москва: Наука, 2020. – 278 с.

3. Гурьева, Е.В. Растительные алкалоиды: получение, структура и фармакологическая активность. – Санкт-Петербург: Издательство СПбГУ, 2018. – 315 с.

4. Kamel, M. S., et al. “Phytochemical and pharmacological studies on Catharanthus roseus.” Pharmaceutical Biology, 2020, 58(1): 234–243.

5. Noble, R.L. “The discovery of the vinca alkaloids — chemotherapeutic agents against cancer.” Biochemistry and Cell Biology, 1990.

Готовы ли биосенсоры к новым вызовам?

Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.

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

Ключевые слова: биосенсоры, биотопливные элементы, микробные и ферментные биосенсоры, электрохимические биосенсоры.

В недавнем Указе Президента о национальных целях развития Российской Федерации биоэкономика определена как одно из основных направлений обеспечения технологической независимости страны и ключевой фактор достижения суверенитета в сфере биотехнологий. Сегодня биоэкономика определяется как сектор мировой экономики, основанный на применении и рациональном использовании биологических ресурсов и биотехнологий, их развитии и внедрении в различных сферах деятельности человека. По оценкам экспертов, в России исследованиями, связанными с биоэкономикой, занимаются 47 институтов. В Институте биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрябина более 30 лет развивается направление электрохимических биосенсоров и биотопливных элементов. В связи с 60-летним юбилеем нашего Института мы решили проанализировать основные исследования, проводившиеся в лаборатории биосенсоров, оценить их вклад в развитие биосенсорной науки в России и соответствие принципам биоэкономики.

Понятие «биосенсор» появилось в 1960-х годах после создания Леландом Кларком-младшим ферментного электрода, который регистрировал изменение концентрации кислорода при окислении глюкозы глюкооксидазой. В дальнейшем, с появлением новых инструментов анализа разрабатывались альтернативные способы измерения активности биокомпонента (электрохимические, оптические, пьезоэлектрические, термометрические сенсоры), а также расширялся круг биологических объектов, используемых в данных устройствах (ферменты, целые клетки, ДНК, антитела и т.д.). В России предметный интерес к биосенсорам возник в начале 90-х годов XX века. Советскими учеными была заложена серьезная теоретическая база для этих исследований – в том числе в области биоэлектрокатализа, ключевого явления для работы многих биосенсоров [1]. В то же время в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрябина сформировался коллектив, чьей задачей стало изучение и создание современных биосенсорных устройств. Основное научное направление лаборатории – использование целых микробных клеток в качестве биочувствительного элемента – было обусловлено спецификой института и наличием в нем богатой коллекции микроорганизмов (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Живые микробные клетки и выделенные из них ферменты активно использовали в качестве биодатчиков для определения широкого спектра химических соединений, а разрабатываемые биосенсоры на их основе, в свою очередь, применяли для изучения фундаментальных процессов жизнедеятельности микроорганизмов. В дальнейшем с развитием этой области классическая двухкомпонентная система «биорецептор-преобразователь» начала трансформироваться в более сложные, многоуровневые платформы. В состав разрабатываемых электрохимических устройств начали внедрять наноматериалы, такие как углеродные нанотрубки, графен, наночастицы металлов, которые способствовали улучшению электронного переноса от биорецептора к преобразователю [2], и полимерные композиты, улучшавшие иммобилизацию рецептора [3]. Использование методов генной инженерии позволило заранее программировать необходимые свойства микробных клеток для биосенсоров. Одной из важнейших проблем, связанных с использованием микробных биосенсоров, является их широкая субстратная специфичность. Для решения этой проблемы использовали не только методы генной инженерии, но и создавали особые электроактивные полимеры, основанные на комбинации медиаторов электронного транспорта, а также применяли методы математической обработки сигнала и искусственные нейронные сети для распознавания образов в смеси определяемых веществ. Применение подобного междисциплинарного подхода обеспечило значительное расширение спектра определяемых веществ. В начале XXI века лаборатория биосенсоров также начала активно развивать смежное и очень перспективное направление — микробные топливные элементы (МТЭ). Принцип их работы аналогичен биосенсорному, но вместо регистрации переноса электронов как

аналитического сигнала, можно осуществлять сбор и хранение генерируемого клетками электрического тока. Использование в качестве субстратов для таких устройств органических отходов (например, из бытовых и промышленных сточных вод) позволяет решить сразу несколько проблем – утилизация отходов, генерация электроэнергии и очистка окружающей среды [4].

Также в лаборатории биосенсоров развивали направление, связанное с медицинской тематикой. Биосенсоры на основе лактатоксидазы и глюкозооксидазы разрабатывали для использования в клинической и спортивной медицине – в том числе для анализа уровня лактата и глюкозы в поту. Применение мембранных фракций микроорганизмов позволило создать прототип самопитаемого устройства и провести его тестирование при имплантации в организм травяной лягушки с использованием эндогенной глюкозы в качестве субстрата. Сегодня лаборатория продолжает оставаться одним из ведущих центров России в области микробной биоэлектроники, внося вклад как в фундаментальную науку, так и в создание портативных, высокочувствительных и доступных аналитических приборов для защиты окружающей среды, контроля качества пищевых продуктов и персонализированной медицины.

Внедрение биосенсоров и биотопливных элементов в различных областях промышленности и сельского хозяйства для контроля производственных процессов, качества получаемых продуктов, оценки степени переработки сырья и качества сточных вод позволяет обеспечить рациональное природопользование, а применение подобных устройств в медицине обеспечивает переход к персонифицированной заботе о качестве жизни пациентов. Все это позволяет рассматривать развитие направления биосенсоров и биотопливных элементов как неотъемлемую часть концепции биоэкономики, позволяющей создавать в будущем комфортную и безопасную среду обитания человека.

Список литературы:

1. Tarasevich, M.R., Yaropolov, A.I., Bogdanovskaya, V.A., Varfolomeev, S.D. Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase" Bioelectrochemistry and Bioenergetics (1979) 6, 393–403, doi:10.1016/0302-4598(79)80006-9.
2. Plekhanova Y., Tarasov S., Bykov A., Reshetilov A. Electrochemical assessment of the interaction of microbial living cells and carbon nanomaterials // IET Nanobiotechnology, 2019, V. 13, Is. 3, p.332-338. 2018/12/24. DOI: 10.1049/iet-nbt.2018.5172.
3. Plekhanova Y., Tarasov S., Reshetilov A. Use of PEDOT:PSS/Graphene/Nafion Composite in Biosensors Based on Acetic Acid Bacteria // Biosensors, 2021, 11 (9), 332. https://doi.org/10.3390/bios11090332.
4. Tarasov S., Plekhanova Y., Kashin V., Gotovtsev P., Signore M.-A., Francioso L., Kolesov V., Reshetilov A. Gluconobacter oxydans-based MFC with PEDOT:PSS/Graphene/Nafion Bioanode for Wastewater Treatment // Biosensors 2022, 12(9), 699. https:// doi.org/10.3390/bios12090699.

Биодеградация высоких концентраций фенола штаммом *Rhodococcus opacus* 3D: биохимические и генетические аспекты

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

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

Ключевые слова: *Rhodococcus opacus*, фенол, иммобилизация клеток, ферменты биодеградации, гены биодеградации.

Фенольные соединения представляют собой обширную группу природных и антропогенных соединений ароматического ряда, содержащих одну или несколько гидроксильных групп. Основными источниками поступления техногенных фенолов в окружающую среду являются отходы металлургической, коксохимической, целлюлозно-бумажной, кожевенной и мебельной промышленности, а также сточные воды производств фенолформальдегидных смол, пестицидов, пластмасс и клеев. Среди данных ксенобиотиков фенол представляет наибольшую распространённость: его содержание в промышленных стоках, в зависимости от специфики производства, может достигать от нескольких миллиграмм до десятков грамм на литр (Mohd, 2020). Одним из наиболее дешёвых и эффективных способов борьбы с фенольным загрязнением является биологическая очистка. Однако высокие концентрации фенола (выше 1.5 г/л) являются токсичными для микроорганизмов и ингибируют рост клеток.

Целью работы являлось изучение возможности деградации высоких концентраций фенола штаммом *Rhodococcus opacus* 3D, а также исследование влияния иммобилизации клеток и их длительного хранения на деструктивную активность штамма. Особое внимание было уделено выявлению биохимических особенностей деградации и исследованию генов, вовлеченных в процесс разложения фенола у данного микроорганизма.

В результате проведенной работы выявлено, что исследуемый штамм *R. opacus* 3D способен к деградации широкого спектра токсикантов, включая н-алканы (октан, нонан, декан, ундекан, додекан, гексадекан) и ароматические соединения (фенол, бензол, толуол, этилбензол, нафталин, 2-гидроксикоричную кислоту, кумарин, фталат, гентизат, протокатехоат). Отличительной особенностью культуры являлась способность утилизировать фенол в высоких концентрациях – до 1,5 г/л и 2,5 г/л, неиммобилизованными и иммобилизованными клетками соответственно.

С помощью сканирующей электронной микроскопии установлено, что обрастание (иммобилизация) исследуемого штамма на поверхности поликапроамидного волокна происходит дискретно в виде кластеров клеток и сопровождается образованием межклеточного матрикса в виде слоёв пленок и фибрилл, обеспечивающего связь клеток между собой и с поверхностью волокна. Кластеры иммобилизованных клеток различаются по величине и количеству находящихся в них клеток. Морфология иммобилизованных клеток *R. opacus* 3D имеет сходство с морфологией свободнорастущих клеток в периодической культуре на феноле. Клетки в кластерах представлены либо палочковидными, либо кокковидными формами. Вероятно, каждый кластер образуется из единственной клетки, иммобилизованной на определённой стадии роста. Показано, что иммобилизованные клетки *R. opacus* 3D могут храниться в неселективных условиях в течение длительного времени (до 2 лет) без значительной потери жизнеспособности и деградативной активности.

Основными ферментами деградации фенола у исследуемого штамма являются пирокатехин-1,2-диоксигеназа (ПК-1,2-ДО) и *цис,цис*-муконатциклизомераза, удельная активность ферментов при росте культуры на феноле составляет 0.115 ± 0.006 мкмоль/мин на 1 мг белка и 0.025 ± 0.007 мкмоль/мин на 1 мг белка соответственно (табл. 1). Как в индуцированных, так и в неиндуцированных фенолом клетках обнаружена высокая активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы (ПКК-3,4-ДО), роль которой в разложении фенола данным штаммом остаётся невыясненной.

Табл. 1. Ферментативная активность штамма *R. opacus* 3Д при росте на минеральной среде с фенолом и сукцинатом

Фермент	Удельная активность, мкмоль/мин на 1 мг белка	
	Фенол	Сукцинат
Пирокатехин-1,2-диоксигеназа	0.115 ± 0.006	0.006 ± 0.003
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000
Цис,цис-муконатциклоизомераза	0.025 ± 0.007	< 0.001
Протокатехоат-3,4-диоксигеназа	0.385 ± 0.061	0.021 ± 0.003

Для идентификации генов деградации фенола у штамма *R. opacus* 3D были использованы специфические праймеры, разработанные на основе последовательности изофункциональных генов ПК-1,2-ДО (*catA*, *catA2*), ПКК-3,4-ДО (*pcaH*) штамма *R. opacus* 1CP (Solyanikova et al., 2016) и генов экстрадиол диоксигеназ (*edoB*, *edoC*) штаммов *Rhodococcus rhodochrous* P200 и *Rhodococcus* sp. I1 (Kulakov et al., 1998). С помощью ПЦР у исследуемой культуры был получен положительный ответ при использовании всех указанных праймеров. Размер амплифицированных продуктов соответствовал ожидаемому и не отличался от контрольного штамма *R. opacus* 1CP. Наличие генов *catA* и *catA2* и высокая активность фермента ПК-1,2-ДО свидетельствует о том, что утилизация фенола у данного штамма происходит через *орто*-путь окисления его ключевого интермедиата – пирокатехина. Гены *мета*-пути окисление катехола у данной культуры, по-видимому, не являются функционирующими или они экспрессируются при утилизации других ароматических субстратов.

На основании проведённого исследования можно заключить, что данный штамм может рассматриваться как эффективный деструктор, способный утилизировать фенол в высоких концентрациях, повышающий свой биодеградационный потенциал при иммобилизации и сохраняющий эту способность при длительном хранении. Таким образом, штамм может быть использован в биотехнологии для очистки водных сред от фенольного загрязнения при высоких концентрациях загрязнителя.

Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, Госзадание №FMRM-2022-0014.

Список литературы:

Mohd A. Presence of phenol in wastewater effluent and its removal: an overview // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2020. V. 102(6): 1–23. https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1738412

Solyanikova I.P., Borzova O.V., Emel'yanova E.V., Shumkova E.S., Prisyazhnaya N.V., Plotnikova N.V., and Golovleva L.A. Dioxygenases of chlorobiphenyl-degrading species *Rhodococcus wratislaviensis* G10 and chlorophenol-degrading species induced in benzoate-grown cells and genes potentially involved in these processes // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81: 986–998. https://doi.org/10.1134/S000629791609008X

Kulakov L.A., Delcroix V.A., Larkin M.J., Ksenzenko V.N., and Kulakova A.N. Cloning of new *Rhodococcus* extradiol dioxygenase genes and study of their distribution in different *Rhodococcus* strains // Microbiology. 1998. V. 144: 955–963. https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-955.

Активность микроорганизмов-деструкторов масляной фракции нефти

Попова А.А., Шеховцова Н.В.

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль
p0v-ana@yandex.ru

Ключевые слова: биоремедиация, масляная фракция нефти, вазелиновое масло, нефтедеструкторы, углеводородокисляющие микроорганизмы, фитотестирование, *Raphanus sativum.*

Нефтяное загрязнение приводит к деградации почвенных экосистем, нарушая их физико-химические свойства и биологическую активность. Естественное восстановление может длиться десятилетиями, что актуализирует разработку методов ускоренной ремедиации, среди которых наиболее экологически безопасной является биодеградация с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов.

Цель работы: изучение активности микроорганизмов-деструкторов масляной фракции нефти (на модели вазелинового масла) и их эффективности в снижении ее фитотоксичности.

В качестве объектов исследования использовали пробы почвы из корнеобитаемого слоя: из зоны совместного произрастания *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop и *Fragaria vesca* L., а также из-под корней *Artemisia vulgaris* L. Из указанных образцов были выделены ассоциированные с растениями микроорганизмы для проведения дальнейших исследований. Для проведения фитотестирования были использованы семена *Raphanus sativum* L. var. oleifera Metzg., имеющие лабораторную всхожесть 95%.

Для накопительных культур использовали селективную среду Варда [3] и минеральную среду [1] с добавлением вазелинового масла (1% об). Для получения изолированных культур производили посев на агаризованные среды соответствующего состава. С целью обогащения полученных изолятов, их пересевали на МПА с суслом (1:1) с добавлением агара. Проверку способности утилизировать углеводороды проводили методом чашечного посева на твердую агаризированную минеральную среду с вырезанными лунками, которые заполнили стерилизованным вазелиновым маслом.

При постановке вегетационного опыта в водной культуре использовали методику, указанную в [2] и адаптированную по результатам собственных предварительных исследований.

В рамках данного исследования были проведены комплексные измерения, включающие количественную оценку длины корневой и побеговой систем, определение сырой биомассы проростков, а также анализ показателей их выживаемости. Первые три параметра были подвергнуты статистической обработке в программе StatAnt (версия 4.1; разработчик Игорь Гайдышев, Россия, 2017 год). Один из этапов включал в себя однофакторный анализ (ANOVA) с учетом условий его применимости. Если оба условия применимости не соблюдались, а логарифмирование не приближало их распределение к нормальному, то использовался непараметрический аналог – критерий Краскела-Уоллиса. При отвержении нулевой гипотезы по результатам дисперсионного анализа проводилось множественное апостериорное сравнение отдельных пар групповых значений с помощью критерия Шеффе (или критерия Данна для непараметрического анализа).

Было получено 17 изолированных культур микроорганизмов, представляющих собой дрожжи, актинобактерии, кокки, грамположительные и грамотрицательные палочки. Тестирование на минеральных средах с вазелиновым маслом выявило 9 штаммов, предположительно способных его утилизировать.

В семидневном вегетационном опыте вазелиновое масло значимо снижало все изучаемые параметры: длину побега (на 15,4%), длину корня (на 43,3%) и сырую массу (на 32%). Наблюдалась высокая гибель проростков (42%) и загнивание корневой системы. Четыре бактериальных изолята полностью компенсировали угнетение роста побега. Однако ни одна из культур не смогла полностью нивелировать негативное влияние на корневую систему и сырую массу, хотя все они статистически значимо повышали выживаемость проростков, снижая долю нежизнеспособных растений с 42% до 4-12%.

Визуальная оценка состояния вазелинового масла во всех пяти сосудах по окончании эксперимента позволила полуколичественно оценить деструктивную активность штаммов (Рис.). Наибольшую активность (5 баллов из 5) проявили штаммы CFW_1 (грамотрицательные палочки) и

CFW_3 (актинобактерии), в вариантах с которыми наблюдалось образование твердых белых скоплений – признак активной утилизации углеводородов. При этом прямая зависимость между визуальной активностью деструкции и улучшением всех фитометрических показателей отсутствовала, что указывает на сложный характер взаимодействия в системе «растение-микроорганизм-углеводороды».

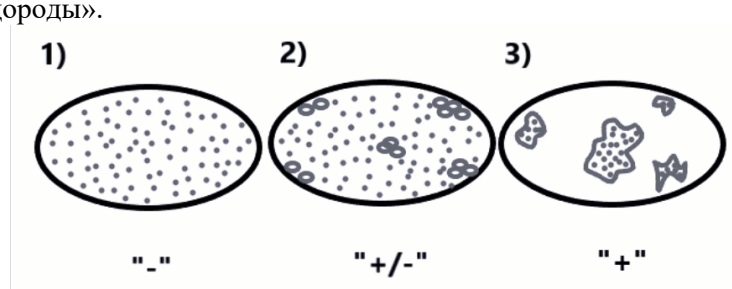


Рис. Варианты распределения вазелинового масла на поверхности воды в конце фитотеста.

1) Равномерное распределение по поверхности без изменений (0 баллов). 2) Частичное эмульгирование масла (0,5 балла). 3) Неоформленные твердые скопления в чистой воде (1 балл).

Таким образом, результаты работы доказывают эффективность применения специфических штаммов-деструкторов для снижения фитотоксичности нефтезагрязнений и подчеркивают перспективность дальнейшего изучения механизмов их защитного действия на растения для разработки биотехнологий восстановления нарушенных почв.

Список литературы:

1. Манучарова Н. А. Микроорганизмы дерново-подзолистой почвы, деградирующие нефть и полициклические ароматические углеводороды / Н. А. Манучарова, М. А. Большакова, Т. Л. Бабич и др. // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 6. – С. 706–717.

2. Маракаев О. В. Экологическая физиология растений: вегетационные опыты: Метод. указания /О. А. Маракаев, О. В. Титова. – Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2003. – 55 с.

3. Ward D. M. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes /D. M. Ward, T. D. Brock // Applied and Environmental Microbiology. – 1976. – Vol. 31, N 5. – P. 764–772.

Новая система лиофилизации Всероссийской коллекции микроорганизмов: разработка, изготовление и испытание

Пучков Е.О., Рыжманова Я.В., Щербакова В.А., Качалкин А.В., Беккаревич А.О.

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

Ключевые слова: коллекция культур микроорганизмов, лиофилизация, бактерии, дрожжи.

Высушивание из замороженного состояния (лиофилизация) с последующим хранением в бескислородной среде наряду с низкотемпературным замораживанием используются в качестве консервирующих приемов для длительного сохранения жизнеспособных микробных культур. Достоинством процедуры лиофилизации является удобная форма и условия хранения, а также возможность передачи культур различным пользователям без специальных требований к транспортировке.

Цель настоящей работы - разработка, изготовление и испытание новой системы лиофилизации микроорганизмов Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Актуальность такой системы связана с интенсивным расширением фонда ВКМ.

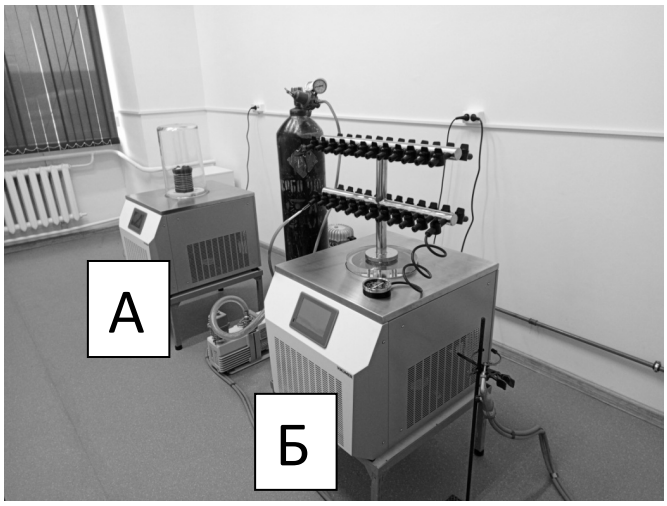


Рис. 1 общий вид системы, созданной на базе двух установок Vikumer® LGJ-10 (Китай).

На Рис.1 показан общий вид системы, созданной на базе двух установок Vikumer® LGJ-10 (Китай). Первая используется для замораживания и лиофилизации (А), вторая для заполнения образцов азотом и отпайки (Б). Образцы микроорганизмов (0.2 мл) лиофилизировали в специальных ампулах с перетяжкой для отпайки ампул с сохранением герметичности. Заполнение образцов азотом после лиофилизации осуществлялось с целью сохранения микроорганизмов в бескислородных условиях.

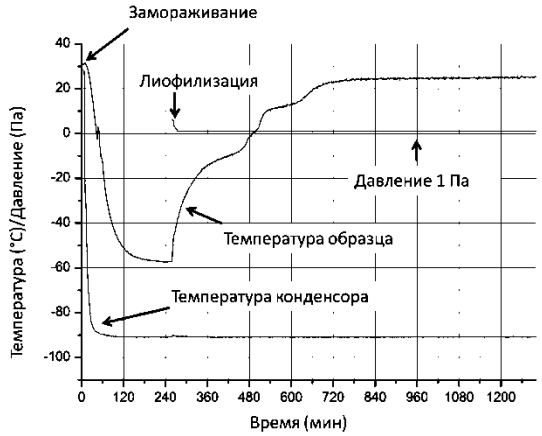


Рис. 2 Типичная термограмма процесса.

Подача химически чистого азота в ампулы производилась через микробиологические фильтры для обеспечения стерильности. Система позволяет осуществлять одновременно лиофилизацию до 46 образцов. Предусмотрена возможность контроля процесса по термограмме, регистрируемой с помощью термопары, устанавливаемой в «контрольный» образец. На Рис. 2 показана типичная термограмма процесса. Лиофилизация запускается при достижении образцами температуры –60 ±0,5°C и проводится при давлении 1 Па. Сложный характер температурной зависимости обусловлен изменением структуры образца и теплопередачи по мере сублимации воды. Свидетельством окончания процесса является достижение комнатной

температуры (12 – 20 часов в зависимости от количества образцов).

Испытания возможностей разработанной системы проводили на культурах дрожжей и бактерий в сравнении со стандартной в ВКМ методикой лиофилизации с отпайкой ампул под вакуумом на модифицированной установке центрифужного типа MicroModulyo. Дрожжевые культуры *Saccharomyces cerevisiae* VKM Y-375^T и *Phaffia rhodozyma* VKM Y-2274^T лиофилизировали в стандартной среде сахароза-желатина-агар. Результаты проверки выживаемости по росту на агаризованной среде после 10 сут. хранения при 20°C, представленные в Табл. 1, свидетельствую о том, что при использовании обеих методик несмотря на то, что происходит гибель части клеток, хотя и в разной степени, важно, что в обоих случаях уровень жизнеспособности культур в образцах остается достаточно высоким для последующего хранения.

Испытания также проводились на бактериальных культурах *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* VKM B-3487^T, *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* VKM B-1799^T и *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* VKM B-1144^T. Состояние культур оценивали по скорости роста и по количеству способных к размножению клеток методом предельных разведений. Результаты представлены в Табл. 2.

Табл. 1. Результаты проверки выживаемости дрожжей.

Культура	Контроль (КОЕ/мл)	Лиофилизация Вакуум (КОЕ/мл)	Лиофилизация N_2 (КОЕ/мл)
VKM Y-375^T	2×10^8	1.5×10^7	3.0×10^7
VKM Y-2274^T	1.2×10^7	2.0×10^6	2.0×10^5

Табл. 2 Результаты проверки выживаемости бактерий.

Культура	VKM B-3487^T		VKM B-1144^T		VKM B-1799^T	
	скорость роста, μ^{-1}	Концентрация клеток, кл/мл	скорость роста, μ^{-1}	Концентрация клеток, кл/мл	скорость роста, μ^{-1}	Концентрация клеток, кл/мл
Хранение 1-2 сут 6°C						
Контроль	0.113	6.7×10^9	0.090	2.5×10^9	0.068	3.5×10^8
Лиофилизация Вакуум	0.105	2.2×10^9	0.065	1.98×10^8	0.055	1.5×10^8
Лиофилизация N_2	0.111	4.8×10^9	0.059	1.74×10^8	0.077	6.0×10^8
Хранение 6 мес 6°C						
Контроль	0.083	2.7×10^8	0.060	2.5×10^6	0.072	5.5×10^8
Лиофилизация Вакуум	0.055	2.1×10^5	0.035	8.9×10^4	0.065	3.15×10^7
Лиофилизация N_2	0.091	3.8×10^8	0.072	1.64×10^8	0.074	3.0×10^8

Полученные данные, в целом, также как и в случае с дрожжевыми культурами свидетельствуют о достаточно высоком уровне жизнеспособности культур для последующего хранения после лиофилизации с использованием новой разработанной системы лиофилизации.

Заключение

Таким образом, разработанная нами новая система лиофилизации может быть использована для сохранения культур микроорганизмов. При этом следует иметь ввиду различную чувствительность разных видов микроорганизмов к этой процедуре.

Компьютеризация подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри с использованием вэб-камеры и программы ImageJ

Пучков Е.О.

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

Ключевые слова: колонии микроорганизмов, компьютерный анализ изображений, вэб-камера, программа ImageJ

Метод подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри служит для оценки содержания жизнеспособных микробных клеток в различных образцах. Для этого из исходного образца делают серию кратных разведений в какой-нибудь жидкой среде и высевают на адекватную для данного вида микроорганизма плотную питательную среду, а затем культивируют при оптимальной температуре. Размножающиеся клетки при определенном разведении проявляются в виде колоний, видимых невооруженным глазом. Оценку содержания жизнеспособных микробных клеток по подсчету колоний представляют в так называемых «колонии образующих единицах» (КОЕ) в пересчете на массу или объем образца (Мейнел, 1967).

Количественный учет колоний непосредственно на чашках Петри является сравнительно трудоемкой и длительной процедурой. С развитием цифровой фотографии и компьютерной техники, обеспечивающей количественный анализ цифровых изображении, появилась возможность компьютеризации этой процедуры. Имеются коммерчески доступные компьютерные счетчики колоний (Пучков, 2010). Вопрос о целесообразности приобретения и использования сравнительного дорогого коммерческого компьютерного счетчика колоний является критическим, особенно в условиях не систематического, а лишь периодического использования данного метода.

Целью данной работы является демонстрация возможности компьютеризации метода подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри с использованием *недорогой* вэб-камеры и компьютерной программы анализа изображений ImageJ 1.42 (National Institute of Health, USA), имеющейся в свободном доступе в интернете (https://imagej.net/ij/).

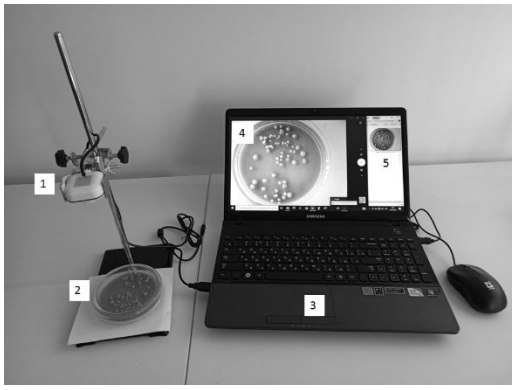


Рис. 1 Композиция вэб-камеры ОК-С8812 (1) на лабораторном штативе с компьютером для регистрации и анализа изображений колоний (на чашках Петри) (2).

На рис. 1 показана использованная в работе композиция вэб-камеры ОК-С8812 (Китай) (1) на лабораторном штативе с компьютером для регистрации и анализа изображений колоний (на чашках Петри) (2). Регистрация и анализ изображений осуществлялась мобильным компьютером (ноутбук, Samsung) (3) с OS Windows 10. Программа "Камера" OS Windows 10 позволяет получать (4) и сохранять (5) цифровые фотоизображения с вэб-камеры.

Эксперименты проводили на образцах колоний дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* VKM Y-375 и *Phaffia rhodozyma* VKM Y-2274, любезно предоставленные к.б.н. А.О. Беккаревич.

Компьютерный подсчет колоний проводили с помощью программы ImageJ 1.42 (National Institute of Health, USA; https://imagej.net/ij/) в соответствии с инструкцией, представленной на сайте (раздел "Documentation").

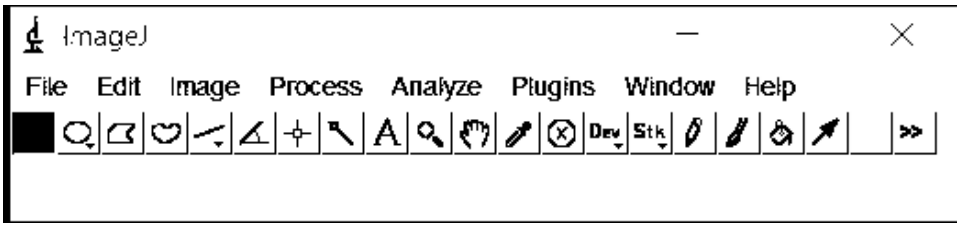


Рис. 2 Интерфейс ImageJ.

Алгоритмы подсчета колоний.

1. В визуальном режиме колонии подсчитывали отметкой курсором выбранной колонии на изображении. Последовательность операций: Plagins > Analyze > Cell Counter > Initialize > Counters (выбирался один из 8 вариантов цветной метки учтенных колоний Type 1...Type 8) > Results > считывание результата. После завершения подсчета результаты сохраняли в формате Excel (Results > File > Save As).

2. Полуавтоматический режим предусматривает предварительную настройку программы на определенный тип объектов изображения, который следует учитывать как колонию. Последовательность операций: Image > Type > 8-bit > Edit > Invert > Select (Oval) > Edit > Clear Outside > Image > Adjust > Threshold > Analyze > Analyze Particles > Summarize > считывание результата.

3. Автоматический режим выполнялся с помощью плагина Colony counter (Счетчик колоний) с сайта https://imagej.net/ij/plugins/colony-counter.html. Последовательность операций: загрузка исходного (цветного) изображения > Type > 8-bit > File > Save As > Plagins > Colony Counter > загрузка сохраненного файла 8-bit > считывание результата.

В серии экспериментов, были сопоставлены результаты анализов визуального, полуавтоматического и автоматического вариантов подсчета на одних и тех же образцах. При этом визуальный подсчет можно считать референсным, так как при этом учитываются все имеющиеся колонии в образце. Было установлено следующее.

1. Методика позволяет достоверно визуально выявлять колонии, минимальный размер которых составляют 0.5 мм (при включенной опции «увеличительное стекло» интерфейса ImageJ (Рис. 2).

2. Как полуавтоматический, так и автоматический вариант, в зависимости от образца, могут давать как близкие и даже равные с визуальным результаты, так и отклонения от визуального в том чисел значительные. Причиной таких отклонений может быть гетерогенность колоний по размерам, наличие конгломератов колоний, а также оптическая неоднородность среды и присутствие в ней не учитываемых визуально микрочастиц.

3. Хронометрирование на примере образца с 70 колониями показало, что время на обработку одного образца, начиная с его загрузки в программу, при визуальном подсчете составило 80 сек, при полуавтоматическом – 63 сек и при автоматическом – 50 сек, т.е. во всех трех вариантах около 1 сек на 1 колонию.

Заключение.

1. Показана возможность использования вэб-камеры для получения цифровых изображений колоний микроорганизмов на чашках Петри и их компьютерного анализа с помощью программы ImageJ 1.42. Такие изображения можно обрабатывать в любое удобное время, сохранять и предавать другим пользователям.

2. Визуальный подсчет колоний на цифровых изображениях чашек Петри с использованием программы ImageJ 1.42 обеспечивает достаточно быстрый и надежный подсчет с одновременным документированием данных в компьютере.

3. Полуавтоматический и автоматический режимы подсчета могут давать отклонения от реального количества колоний.

Автор выражает благодарность к.б.н. А.О. Беккаревич за любезно предоставленные образцы колоний дрожжей Saccharomyces cerevisiae VKM Y-375 и Phaffia rhodozyma VKM Y-2274.

Список литературы:

1. Мейнел, Дж., Мейнел Э. Экспериментальная микробиология. М.: Мир, 1967, с. 28 – 35.
2. Пучков Е.О. Компьютерный анализ изображений колоний микроорганизмов. (Обзор)// Микробиология. 2010.Т. 79, №2, С. 160–165.

Разработка способов получения метилмуконовой кислоты на основе рекомбинантной катехол 1,2-диоксигеназы

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

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

Ключевые слова: муконовая кислота, метилмуконовая кислота, катехол 1,2-диоксигеназа, биосинтез.

цис,цис-Муконовая кислота (*cc*MA) является дикарбоновой кислотой с сопряженными двойными связями, которая образуется в результате интрадиольного расщепления катехола под действием фермента катехол-1,2-диоксигеназы (C12O) в метаболических путях микроорганизмов. Это соединение служит ценным предшественником для синтеза промышленно важных полимеров, включая полиамиды (например, нейлон-6,6), полиэфиры и полиуретаны, используемые в производстве пластмасс, волокон и композитных материалов (Xie et al., 2014; Coupe et al., 2020; Choi et al., 2020; Khalil et al., 2020). В отличие от энергоемкого и неэкологичного химического синтеза из нефтяного сырья (Khalil et al., 2020), биокаталитический путь обладает преимуществами высокой селективности, производительности и позволяет получать замещенные производные *cc*MA, способные придавать полимерам новые свойства.

Несмотря на то, что известны многочисленные пути биоконверсии в *cc*MA широкого спектра соединений: толуола, фенола, бензоата, салициловой кислоты, катехола, крафт-лигнина, лигносульфоната, ванилина, ксилозы, глюкозы, глицерина, хоризмата, антранилата, метана (Xie et al., 2014; Coupe et al., 2020; Choi et al., 2020; Molinari et al., 2023), биосинтез ее замещенных аналогов, освещен в литературе недостаточно. Известны единичные примеры, такие как получение 2-фтормуконовой кислоты из 3-фторбензоата с помощью клеток *Pseudomonas putida* (Wirth and Nikel, 2021), 3-алкил- и 3-этилмуконовых кислот из соответствующих 4-алкил- и 4-этилкатехолов(Leng et al., 2024), а также недавно описанный синтез 2-метил- и 3-метилмуконатов из соответствующих крезолов с использованием генно-инженерного штамма *P. putida* KT2440 (Henson et al., 2022).

В настоящей работе нами была разработана экспрессионная система на основе клеток *E. coli* для получения рекомбинантной C12O из *Rhodococcus opacus*. Помимо использования целых рекомбинантных клеток, а также рекомбинантного фермента, был разработан метод иммобилизации данного фермента на магнитных силиконизированных наночастицах. Показана эффективная конверсия 4-метилкатехола в 3-метилмуконат с использованием трех форм биокатализатора: очищенного рекомбинантного фермента, клеток *E. coli*, экспрессирующих C12O, и иммобилизованного на магнитных наночастицах фермента. Таким образом, представленные биокаталитические системы перспективны для создания экологичных процессов получения замещенных муконатов.

Исследования выполнены в рамках НИР Минобрнауки РФ «Молекулярные механизмы биодеградации ксенобиотиков» №122040100068-4.

Список литературы:

Xie N-Z, Liang H, Huang R-B, Xu P. Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. Biotechnol Adv. 2014 32:615–622.

Coupe F, Petitjean L, Anastas PT, Caijo F, Escande V, Darcel C. Sustainable oxidative cleavage of catechols for the synthesis of muconic acid and muconolactones including lignin upgrading. GreenChemistry, 2020, 22(18):6204-6211.

Choi S, Lee H-N, Park E, Lee S-J, Kim E-S. Recent advances in microbial production of *cis,cis*-muconic Acid Biomol. 2020 10:1238.

Khalil I, Quintens G, Junkers T, Dusselier M. Muconic acid isomers as platform chemicals and monomers in the biobased economy. Green Chem. 2020 22:1517-1541.

Molinari F., Pollegioni L., Rosini E. Whole-cell bioconversion of renewable biomasses-related aromatics to *cis,cis*-muconic acid. ACS Sustainable Chem. Eng. 2023, 11, 2476−2485

Leng J, Zhong J, Zhou C, Chu J, Zhu C, Liu D, Chen Y, Ying H, Niu H. Engineering the catechol 1,2-dioxygenase from *Arthrobacter* sp. with improved activity toward 4-alkyl substituted catechols. Molecular Catal. 2024 564:114317.

Henson WR, Rorrer NA, Meyers AW, Hoyt CB, Mayes HB, Anderson JJ, Black BA, Jayakody L, Katahira R, Michener WE, VanderWall TA, Salvachúa D, Johnson CW, Beckham GT. Bioconversion of wastewater-derived cresols to methyl muconic acids for use in performance advantaged bioproducts. Green Chem. 2022 24:3677.

Колонизация ассоциативными микроорганизмами и обработка препаратом Абиопептид® улучшает рост растений *Brassica juncea* L. и их устойчивость к стрессам

Рукавцова Е.Б.[1], Шмарев А.Н.[2], Креславский В.Д.[2], Звонарев А.Н.[3], Пунтус И.Ф.[3], Ахметов Л.И.[3], Филонов А.Е.[3], Ариповский А.В.[4], Захарченко Н.С.[1]

[1]Филиал ГНЦ Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пущино
ruk@bibch.ru
[2]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт фундаментальных проблем биологии РАН)
vkreslav@rambler.ru
[3]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
filonov.andrey@rambler.ru
[4]НПК «А-БИО», Пущино
aripovsky@rambler.ru

Ключевые слова: Абиопептид®, *Brassica juncea* L., колонизация растений, ассоциативные микроорганизмы, абиотический стресс

В современном сельском хозяйстве для повышения урожайности в последние годы используются стимуляторы роста растений, такие как белковые гидролизаты (БГ) или смеси аминокислот, которые получают из источников белка путем частичного гидролиза. БГ в основном образуются в результате химического или ферментативного гидролиза белков, содержащихся в побочных продуктах агропромышленного комплекса животного или растительного происхождения. Во время обработки растений БГ поглощаются корнями и листьями, а затем транспортируются по растению. Однако корни растений усваивают только 6-25% БГ, а остальная часть утилизируется микроорганизмами в почве. Механизм действия БГ еще недостаточно изучен. В частности, они могут действовать как сигнальные соединения, приводящие к физиологическим, морфологическим и биохимическим изменениям в растениях.

В данной работе для обработки растений использовали ферментативный гидролизат соевого белка Абиопептид® (НПК «А-БИО», Московская обл., г. Пущино). Целью работы являлось изучение эффектов совместной обработки растений Абиопептидом® и колонизации полезными ассоциативными бактериями *Pseudomonas putida* KT2442 и *Rhodococcus erythropolis* X5 на рост растений горчицы сарептской *Brassica juncea* L. в условиях *in vitro* и *in vivo*. Устойчивость фотосистемы II фотосинтетического аппарата растений, колонизированных *R. erythropolis* X5, и обработанных Абиопептидом®, оказалась во много раз выше, чем у контрольных растений при повышенной температуре (4 ч, 40°C). Показано, что такие растения более устойчивы и к воздействию света высокой интенсивности (4 ч, 1000 мкмоль квантов/м^{2}с). Кроме того, обработка колонизированных растений препаратом Абиопептид® повысила толерантность горчицы сарептской к засухе в условиях *in vivo*. Обработанные Абиопептидом® колонизированные растения зацвели в теплице на неделю раньше и имели среднюю массу семян на 20-30% больше, чем в контроле. В семенах колонизированных растений, обработанных Абиопептидом®, общее содержание жирных кислот, включая ненасыщенные жирные кислоты (линолевую и олеиновую кислоты), было на 12% выше, чем в контрольных растениях. Полученные данные свидетельствуют о том, что Абиопептид® является перспективным препаратом для применения в сельском хозяйстве. Использование этого препарата в сочетании с полезными ассоциативными бактериями приводило к увеличению массы зерна, содержания ненасыщенных жирных кислот и к устойчивости растений к абиотическим стрессам. В дальнейшем нами будут проанализированы механизмы, приводящие к таким эффектам.

Воздействие биоцидов на образование сульфида прокариотами из Приразломного нефтяного месторождения

Самигуллина С.Р., Биджиева С.Х., Назина Т.Н.

ФИЦ «Биотехнологии РАН» (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского)
samigullinasr@my.msu.ru

Ключевые слова: биокоррозия, сульфатвосстанавливающие бактерии, сульфидогенез, биоциды, нефтяная микробиология.

Приразломное нефтяное месторождение расположено на шельфе Печорского моря. На месторождении ведется добыча тяжелой высокосернистой нефти сорта ARCO. В связи с повышенным содержанием серы в нефти (2,3%), на месторождении наблюдается коррозия нефтепромыслового оборудования, одним из ключевых факторов которой является жизнедеятельность микроорганизмов несмотря на использование ряда биоцидов. Наиболее известные агенты коррозии – сульфидогенные прокариоты, включающие сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) и археи, образующие HS^--ионы, которые химически взаимодействуют с железом стенок трубопроводов, вызывая общую коррозию стали. В настоящее время список агентов биокоррозии существенно расширился и включает синтрофные бактерии, метаногены, железовосстанавливающие и железоокисляющие бактерии, бродильные и ацетогенные бактерии, метаногенные археи. Последние способны получать электроны непосредственно с Fe^0, используя углекислоту в качестве источника углерода, что приводит к точечной, питтинговой коррозии. Главным фактором устойчивости ассоциаций коррозионно-активных прокариот к биоцидам является образование биопленок на стенках нефтепроводов. В толще биопленки различные группы бактерий распределяются в соответствии с предпочтительным Eh среды и по градиенту доступного субстрата, синтезируют внеклеточный матрикс, защищающий их от внешних воздействий.

Для борьбы с биокоррозией нефтяные компании используют биоциды. Ряд доступных на рынке биоцидов содержит метанол в качестве одного из компонентов. Известно, что многие СВБ используют метиловый спирт в качестве источника углерода и энергии. Более того, биоциды не оказывают существенного воздействия на бактериальные клетки, заключенные во внеклеточный экзополисахаридный (ЭПС) матрикс, формирующий биопленки. ЭПС препятствуют проникновению антимикробного агента вглубь бактериального мата. Кроме того, в биопленках лучше сохраняются гены антибиотикорезистентности. Обработка биоцидами зачастую проводится с некоторой периодичностью, что может способствовать развитию устойчивости микробных ассоциаций на стенках нефтепромыслового оборудования к действующим веществам биоцидов.

Целью работы было установить состав прокариот из проб жидкостей системы подготовки воды Приразломного нефтяного месторождения и оценить их устойчивость к биоцидам, применяемым на месторождении.

В ходе исследования были использованы микробиологические, аналитические, молекулярно-биологические и биоинформатические методы.

Объектами исследования послужили пробы жидкостей из системы подготовки воды Приразломного нефтяного месторождения: проба V20002 пластовой воды из добывающих скважин, проба T53001 из емкости для безопасных стоков, включающая стоки с оборудования, крыш, вертолетной площадки и установки очистки сточных вод, и проба нагнетаемой в пласт воды V49001, представленная смесью пластовой, морской и сточной воды.

Ранее был определен состав прокариотных сообществ исследуемых проб методом анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК (Sokolova et al., 2025). В пробе пластовой воды V20002 присутствовали термофильные СВБ (родов *Thermacetogenium, Desulfonauticus* и *Desulfacinum*), сульфитвосстанавливающие бактерии (*Desulfitibacter*), бродильные бактерии (*Caminicella, Kosmotoga* и *Petrotoga*), а также археи рода *Methanothermococcus*. Сульфат- и сульфитвосстанавливающие бактерии способны восстанавливать окисленные соединения серы до сульфид-иона, вызывая общую химическую коррозию стали. В пробе сточных вод T53001 преобладали мезофильные бактерии родов *Faecalibacterium*, *Segatella*, *Blautia*, ассоциированные с кишечником человека. В пробе воды V49001, нагнетаемой в пласт, преобладали бактерии из морской воды родов *Arcobacter* и *Marinobacterium*, в минорных количествах присутствовали

прокариоты из пластовой воды: метаногенные археи рода *Methanolobus* и СВБ рода *Thermacetogenium* (Sokolova et al., 2025).

В настоящей работе было оценено влияние ряда биоцидов, используемых на Приразломном месторождении, на образование сульфид-иона микроорганизмами из приведенных выше трех проб жидкостей из системы подготовки воды. В состав биоцидов входили метанол, изопропанол, глутаровый и щавелевый альдегиды, формальдегид, этиленгликоль, бензилдиметилалкиламмоний хлорид, тетракисгидроксиметилфосфониум сульфат, гетероциклические полимеры и пр. в различных комбинациях. Исследования эффективности биоцидов проводились как на оригинальных пробах жидкостей, так и на полученных из этих проб накопительных культурах сульфидогенов, а также на чистой культуре СВБ. Эксперименты проводили с использованием биоцидов в трех концентрациях (50, 150 и 300 мг/л) при температуре инкубации 24 и 48°С. Биоциды, содержащие в составе метиловый спирт, оказались менее эффективны, чем биоцид, в котором основным компонентом был тетракисгидроксиметилфосфониум сульфат. Сульфидогенные прокариоты в пробах пластовой воды V20002 были слабо подвержены действию биоцидов, в отличие от пробы нагнетаемой воды V49001. Примечательно, что в накопительной культуре из пробы V49001 образование сульфида увеличивалось после обработки биоцидом, состоящим из метанола и альдегида (по сравнению с контролем без биоцида). Для лучшего понимания действия исследуемых биоцидов, был проведен ряд опытов с чистой культурой СВБ *Desulfoplanes* sp. штамм PS50 из Архангельского нефтяного месторождения, для которого биоциды на основе метанола и альдегидов также не показали эффективности ни в одной из исследованных дозировок.

Приведенные результаты свидетельствуют о присутствии коррозионно-активных прокариот в большинстве исследованных проб из Приразломного нефтяного месторождения. С использованием накопительных и чистых культур сульфидогенов были уточнены эффективные концентрации 7 биоцидов с разными химическими составами. Прокариоты, обнаруженные в исследованных пробах жидкостей, были способны использовать метанол процессах сульфидогенеза, в связи с этим метанолсодержащие биоциды демонстрировали эффективность только при использовании в более высоких концентрациях. Таким образом, остается актуальной проблема поиска действенных биоцидов на нефтяных месторождениях для борьбы с биогенной коррозией.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-64-00019-П).

Список литературы

1. Sokolova D.S., Kruglova A.A., Semenova E.M., Mayorova T.A., Mardanov A.V., Nazina T.N., Molecular and cultural evidence of corrosive microorganisms in an offshore oil field in the Arctic (Russia), mSystems, 2025, vol. 10. https://doi.org/10.1128/msystems.01161-25 (In press).

Оценка потенциала завальных зон угольных шахт для контролируемой генерации биометана

Тайлаков А.А.

ФГБОУ ВО Кузбасский государственный технический университет им. Т.Ф. Горбачева
aleksandr.tailakov@mail.ru

Ключевые слова: метан, бактерии, завальный участок, уголь, биометаногенез, биоинженерия угольного газа.

Анаэробные завальные пространства угольных шахт содержат микробные сообщества, способные к биогенному образованию метана. Этому свидетельствует ряд исследований, в том числе изотопный анализ, который показал содержание более легких изотопов углерода ^{12}C в метане [1,2]. Шахтная микрофлора способна к синтезу биогенного метана через ацетокластические и водородотрофные пути. Ряд лабораторных и полевых исследований показал продукцию биометана из угля и углепластовых вод: метаногенные сообщества в сочетании с бактериальной деполимеризацией угля могут генерировать ацетат, H_2 и CO_2 — субстраты для архей [3,4]. Завалы характеризуются локальной анаэробией, повышенной трещиноватостью и накоплением воды — условиями, благоприятными для микробной активности. Цель исследования — оценить возможность использования завальных зон, как «техногенного биореактора» и разработать гибкую математическую модель для прогнозирования выработки метана, как топлива.

Материалы и методы.

Предложена двухуровневая модель: (1) эмпирическая аппроксимация кумулятивной кинетики Гомпертцем и (2) механистическая система - обыкновенное дифференциальное уравнение, учитывающая гидролиз полимерной органики, субстратную динамику и рост трёх функциональных групп микроорганизмов.

Эмпирическая форма (модифицированный Гомпертц):

$$G(t) = G_0 \exp\left[-\exp\left(\frac{R_{\max}}{G_0}(\lambda - t) + 1\right)\right]$$

где $G(t)$— кумулятивный выход CH_4 (мл·г$^{-1}$), G_0— потенциальный выход, $R_{\max}$— максимальная скорость, λ— лаг.

Механистическая минимальная структура (функционально):

$$\dot{P} = -k_h X_h \frac{P}{K_P + P},$$

$$\dot{M} = Y_{hM} k_h X_h \frac{P}{K_P + P} - k_m X_m \frac{M}{K_M + M} - k_{cons} X_a \frac{M}{K_{Ma} + M},$$

$$\dot{X}_i = \mu_i \frac{S_i}{K_i + S_i} X_i - d_i X_i (i = h, a, m),$$

$$\dot{G} = k_m X_m \frac{M}{K_M + M} + k_{mh} X_m \frac{H}{K_H + H} + (\text{десорбция}) - \text{вынос}$$

где P— «полимерный» запас угля, M, H— ацетат и водород, X_h, X_a, X_m— гидролизёры, ацетогены и метаногены; параметры k, μ, K, d, Yимеют биохимический смысл и подлежат калибровке.

Модель имеет модульную архитектуру, что позволяет интегрировать транспортные (адвекционно-диффузные) процессы, ингибиторы (SO_4^{2-}, O_2), температурную зависимость и управляемые входы (инъекции питательных веществ или H_2/CO_2).

Переход от удельного выхода (мл·г$^{-1}$) к объёму в пласте выполняется по шагам. Пример: при $G_{end} = 5$мл·г$^{-1}$, объёмная плотность $\rho_b = 1300$kg·m^{-3}, толщина зоны $h = 1$m и доля биодоступного угля $f_{acc} = 0.2$:

$$M_{\text{g/m}^2} = \rho_b h \cdot 1000 = 1\,300\,000 \text{ g/m}^2; M_{acc} = 260\,000 \text{ g/m}^2.$$

Тогда объём CH_4 на 1 m^2: $V = G_{end} \cdot M_{acc} \cdot 10^{-6} = 1.3$ m^3. На гектар (10^4 m^2) — ≈13×10^3 m^3. Такой порядок показывает практическую значимость при благоприятных условиях; итоговая оценка чувствительна к f_{acc}, G_{end}и объёмным параметрам.

Результаты моделирования и обсуждение.

Калибровочные запуски показали, что модель чувствительна к присутствию метаногенов (μ_m) и параметрам гидролиза (k_h, Y_{hM}). Увеличение μ_mпри прочих равных может многократно увеличить G_{end}, тогда как превышение начальной концентрации субстрата (ацетат) влияет на форму кривой и может приводить к пересечениям семейства кривых (быстрый старт и раннее истощение против длительной отдачи). Пористость и доступность к порам контролируют скорость массопереноса и десорбции, ингибиторы (сульфаты, кислород) способны существенно снижать выход метана. Модель позволяет тестировать сценарии биостимуляции (инъекции питательных веществ, контроль влажности, подача H_2/CO_2) и оценивать риск выделения газа.

Оценка использования шахты, как биореактора.

Завал предоставляет ряд преимуществ таких, как большая доступная масса органики, ограниченный доступ кислорода, повышенное количество трещин и разломов, возможность локального управления подачей питательных веществ. Наряду с преимуществами существуют риски: безопасность (взрывоопасность CH_4), образование побочных газов (H_2S, CO_2), возможные негативные изменения геомеханики. С учётом контроля и мониторинга газовыделения, завал теоретически, может быть использован для биоинженерии угольного газа, однако необходимы биогеохимический контроль и строгая оценка рисков.

Выводы:

Завальные пространства угольных шахт создают условия для биометаногенеза. Имеющиеся исследования подтверждают биогенную природу части шахтного метана.

Разработанная модульная математическая модель объединяет биохимические и физические процессы, что позволяет прогнозировать динамику и объёмы CH_4 при разных сценариях.

Практическая пригодность завала, как техногенного биореактора, зависит от доли биодоступного угля, численности микробного сообщества, участвующего в образовании биогенного метана и адвекционно-диффузных условий — модель помогает определить уязвимые параметры и оптимальные стратегии.

Список литературы:

1. Тайлаков О.В. // Определение источников газовыделения в атмосферу выемочного участка на основе измерений изотопного состава углерода метана // Тайлаков О.В., Макеев М.П., Герасимов А.В., Коровин Д.С. // Вестник Кузбасского государственного технического университета. 2017. № 5 (123). С. 73-79.

2. Pytlak, A., Stepniewska, Z., Kuźniar, A., Szafranek-Nakonieczna, A., Wolińska, A., Banach, A.// Potential for Aerobic Methane Oxidation in Carboniferous Coal Measures. Geomicrobiol. J. 2014. Volume 31. Pages 737–747. doi: 10.1080/01490451.2014.889783.

3. Ван Ю., Чжан Х. Анализ биогенного метана в угольных пластах Северного Китая. // Journal of Natural Gas Science and Engineering. – 2021. – Vol. 89. – P. 103–110.

4. Ли Ц., Чен Г. Влияние биометаногенеза на газодинамику угольных пластов. // Coal Science and Technology. – 2020. – Vol. 48, № 4. – P. 450–458.

Одностадийное формирование высокопроводящего электрода для микробного БТЭ

Тарасов С.Е. [1]***, Плеханова Ю.В.***[1]***, Быков А.Г.***[1]***, Перчиков Р.Н.***[2]***, Решетилов А.Н.***[1]

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

[2] ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула

Ключевые слова: *Gluconobacter oxydans*, оксид графена, микробное восстановление графена, биотопливный элемент, биопленка.

При создании биотопливных элементов (БТЭ) необходимо обеспечить высокую проводимость электронов в системе, поэтому электроды часто модифицируют различными высокопроводящими компонентами, например наноматериалами. Применение графеновых наноматериалов позволяет увеличить площадь поверхности и электропроводность, не оказывая токсического действия на микроорганизмы. Обычно получение наноматериалов связано с использованием жестких условий синтеза, дорогостоящих реактивов, дополнительных методов очистки. Кроме того, полученные наноматериалы необходимо заранее встроить в состав электродов БТЭ, что неминуемо увеличивает трудозатраты и время подготовки элементов к работе. В последние годы все большее развитие получают методы «зеленой химии», которые отличаются более мягкими условиями реакций и минимальным воздействием на окружающую среду. Ранее [1] нами была показана способность уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans* к восстановлению оксида графена (ОГ) в гомогенных условиях с получением восстановленного оксида графена, позволяющего модифицировать графитовые печатные электроды и получать увеличение сигнала биосенсора в 6-8 раз.

В данной работе экологически чистый метод синтеза восстановленного оксида графена с помощью уксуснокислых бактерий применили для одностадийного формирования 3D-биоанодов микробного топливного элемента. При этом стадии роста микроорганизмов, восстановления оксида графена и формирования готового биоанода БТЭ происходит одновременно и непосредственно в ячейке БТЭ.

В работе использовали *Gluconobacter oxydans* sbsp. industrius ВКМ В-1280, оксид графена (лаборатория спектроскопии наноматериалов Института проблем химической физики РАН, Черноголовка), войлочные электроды 1x1x3 см (SinoTek, Китай). В качестве медиаторов электронного транспорта использовали 2,6-дихлорфенолиндофенол (2,6-ДХФИФ) и гексацианоферрат калия (III) (ГЦФ) в анодном и катодном отделении, соответственно (Merck, США).

Для оценки степени восстановления графена применяли метод спектроскопии комбинационного рассеяния. Было показано, что при культивировании клеток в присутствии оксида графена в образцах наблюдается уменьшение содержания кислорода и увеличение доли областей углеродной сетки с sp2-связями, что свидетельствует об эффективном восстановлении графена клетками *G. oxydans*.

Изучали изменение мощности полученных БТЭ при различных условиях формирования анодов методами циклической вольтамперометрии, импедансной спектроскопии и хроноамперометрии. Для формирования анода БТЭ рост биопленки проводили в присутствии оксида графена при подаче постоянного тока (50 мкА) и при его отсутствии. Показано, что при подаче тока в течение 72 часов формируемый анод в составе БТЭ генерировал большее количество энергии и показал увеличение мощности на 75 % в присутствии субстрата (рис. 1), по сравнению с контрольным биоанодом.

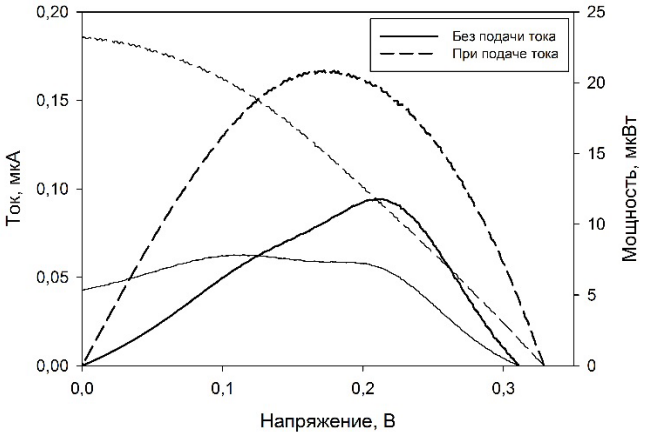


Рис. 1. Виды поляризационных и мощностных зависимостей микробных БТЭ в зависимости от условий формирования биоанода.

Таким образом, был разработан одностадийный метод одновременного получения наноматериала, биопленки и формирования биоанода БТЭ и изучены основные его характеристики. Метод может быть использован для быстрого и эффективного формирования БТЭ в экологическом мониторинге без использования дополнительных процедур синтеза наноматериалов.

Список литературы:

1. Быков А.Г., Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Баскаков С.А., Решетилов А.Н. На что еще способен *Gluconobacter oxydans*? // IX Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Сб. тезисов. под редакцией д.б.н. Т.А. Решетиловой. М.: ООО «ГЕОС». 2023. С. 92 – 94. 5-7 декабря 2023 г., Пущино. DOI: 10.34756/GEOS.2023.17.38725.

Получение тестостерона в ферментёрах при биоконверсии фитостеринов трансгенным штаммом *mycolicibacterium neoaurum*

Тимакова Т. А., Текучева Д.Н., Карпов М.В., Фокина В. В., Шутов А.А., Донова М. В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино
tatianka.rz@yandex.ru

Ключевые слова: тестостерон, фитостерин, биоконверсия, трансгенный штамм, оптимизация.

Тестостерон является главным мужским половым гормоном, играющим важную роль в организме человека (Barone *et al*., 2022, Tekucheva *et al*., 2022). Одностадийное биотехнологическое получение тестостерона, основанное на микробиологической конверсии растительных стеринов, является альтернативой производству тестостерона химическим способом из андростендиона (АД) (Tekucheva *et al*., 2022, Tekucheva *et al*., 2024). В одноэтапном процессе получения тестостерона из фитостеринов используется трансгенный штамм на основе *M. neoaurum* ВКМ Ac-1816Д, ко-экспрессирующий гены, кодирующие 17β-гидроксистероиддегидрогеназу (17β-ГСД) из гриба *Cochliobolus lunatus* (17β-ГСД$_{Cl}$) и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу из бактерии *Mycobacterium tuberculosis* (Г6ФД$_{Mt}$) под контролем ацетамидазного промотора P$_{ami}$ (Strizhov *et al*., 2016). Целью исследования являлись масштабирование и оптимизация условий биоконверсии фитостеринов в высокой концентрации (20 г/л) в тестостерон в ферментёрах, включающая оптимизацию концентраций индуктора, солюбилизатора и глюкозы.

Увеличение концентрации индуктора синтеза рекомбинантных белков – ацетамида – с 3 до 9 г/л при его трёхкратном внесении оказывало положительное влияние на накопление тестостерона, с достижением максимального выхода целевого продукта 39±2% мольн. (рис. 1А).

Изучение влияния различных концентраций солюбилизатора – метилированного β-циклодекстрина (МЦД) – на полноту биоконверсии фитостеринов позволило выявить оптимальную концентрацию МЦД, соответствующую мольному соотношению фитостерины:МЦД = 1:0,8, обеспечивающую получение 42±2,1% мольн. тестостерона за меньшее время биоконверсии (120 ч) по сравнению с вариантом мольного соотношения фитостерины:МЦД = 1:1,6 (204 ч) (рис.1Б).

Трёхкратное внесение глюкозы в среду биоконверсии в концентрации 10 г/л на одну добавку позволяет достичь более высокой концентрации тестостерона по сравнению с однократным добавлением глюкозы (рис.1В). Добавление глюкозы на этапе биоконверсии фитостеринов, при котором происходит восстановление АД до тестостерона, способствует образованию восстановленных кофакторов НАД(Ф)Н (Tekucheva *et al*., 2022).

Полученные результаты могут быть использованы при разработке технологии получения тестостерона путём микробиологической конверсии фитостеринов в концентрации 20 г/л.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 122040500054-3).

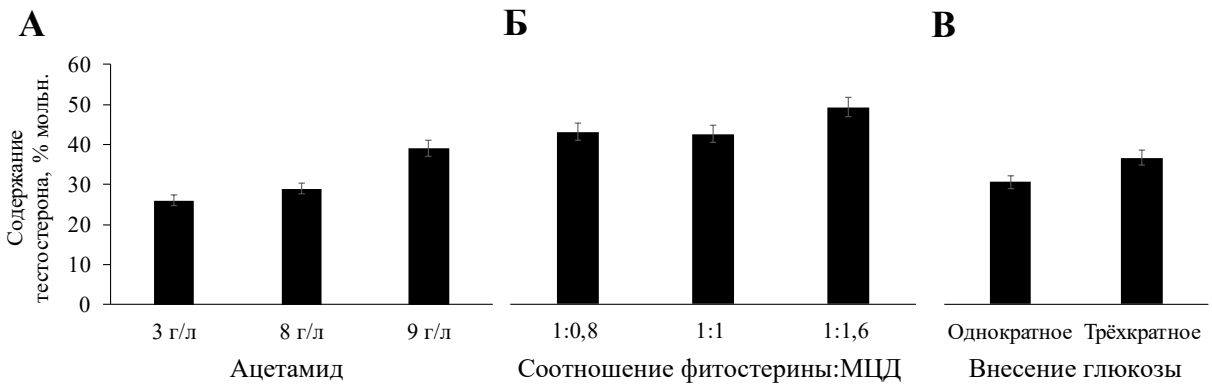


Рис.1 Содержание тестостерона (% мольн.) при биоконверсии фитостеринов в концентрации 20 г/л трансгенным штаммом M. neoaurum Ac-1816Д: А – при трёхкратной индукции ацетамидом в концентрации 3, 8 и 9 г/л; Б – при различном мольном соотношении фитостерины:МЦД; В – при однократном и трёхкратном внесении глюкозы в концентрации 10 г/л на одну добавку.

Список литературы:

1. Barone B., Napolitano L., Abate M. et al. The Role of Testosterone in the Elderly: What Do We Know? Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. №7. P. 3535. doi: 10.3390/ijms23073535.
2. Strizhov N., Karpov M., Sukhodolskaya G., Nikolayeva V., Fokina V., Shutov A., Donova M. Development of mycobacterial strains producing testosterone. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of chemical sciences. 2016. V. 3. P. 57-58. https://isopsoc.org/assets/files/conf-23.pdf.
3. Tekucheva D.N., Nikolayeva V.M., Karpov M.V., Timakova T.A., Shutov A.V., Donova M.V. Bioproduction of testosterone from phytosterol by Mycolicibacterium neoaurum strains: "one-pot", two modes. Bioresour. Bioprocess. 2022. V. 9. № 116. https://doi.org/10.1186/s40643-022-00602-7.
4. Tekucheva D.N., Karpov M.V., Fokina V.V., Timakova T.A., Shutov A.A., Donova M.V. Single-stage bioconversion of phytosterol into testosterone by recombinant strains of Mycolicibacterium neoaurum. Microbiology (Moscow). 2024. V. 93. № 2. P. 134-138. https://doi.org/10.1134/S0026261723603913.

Стабильность капсул с лактобациллами с использованием альгината натрия и хитозана

***Федорова Е.С.*[1,2] *, Хакимова Л.Р.* [1,3]*, Миннибаева А.В.* [2]*, Фазлинурова Р.Р.* [2]*, Чубукова О.В.* [1,3]*, Вершинина З.Р.* [1,3]

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», кафедра «Школа молекулярных технологий», Уфа
[2]ООО «Научно-внедренческое предприятие «БашИнком», Уфа
[3]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа
FedorovaKatyaBi@yandex.ru

Ключевые слова: капсулирование, альгинат натрия, хитозан, пробиотики, лактобациллы.

Пробиотики — это живые микроорганизмы, которые при использовании в достаточных количествах приносят пользу здоровью человека (Dahiya and Nigam, 2022). Однако кислотная среда желудка, желчные соли, иммунные клетки и активные формы кислорода в организме человека препятствуют колонизации и росту чужеродных бактерий, входящих в состав пробиотиков, тем самым снижая их терапевтическую эффективность. Поэтому на данный момент является актуальным разработка стратегий и технологий инкапсуляции живых бактерий с использованием биополимеров для создания защитных оболочек на поверхности бактерий, что позволит решить данную проблему (Teng et al., 2025).

Технология инкапсуляции пробиотиков работает по принципу иммобилизации клеток и осложняется необходимостью сохранения жизнеспособности бактерий во время всего процесса. Поэтому применяются различные биосовместимые инкапсулирующие агенты, которые не только защищают пробиотические бактерии от агрессивных условий окружающей среды и желудка, но и способствуют их росту (Naeem et al., 2025).

При этом самым распространённым и недорогим вариантом инкапсуляции является иммобилизация бактерий в альгинаты с последующей сшивкой хлористым кальцием. Также возможно применение дополнительного слоя на основе хитозана для минимизации воздействия кислой среды ЖКТ, так как показано, что многослойное покрытие капсул хитозаном повышает защитные свойства и может применяться для повышения выживаемости пробиотических бактерий в очень кислых условиях (Какимова и др., 2015).

Целью работы было исследование способности сохранять жизнеспособность лактобацилл после инкапсулирования в течение 3-х месяцев.

Проведена оценка стабильности инкапсурованных клеток лактобацилл *Lactobacillu splantarum* L1 с использованием альгината натрия и хитозана. В работе использовали культуральную жидкость (КЖ) и осажденную из нее биомассу. Изначальный титр КОЕ лактобацилл в КЖ был $1{,}1*10^8$ КОЕ/мл, в осажденной биомассе – $1{,}9*10^9$ КОЕ/мл. Исследуемые образцы лактобацилл смешивали с 2% раствором альгината натрия в соотношении 1:4. Капсулирование проводили в 2,2% растворе хлорида кальция с помощью стерильного шприца объемом 10 мл, для повышения прочности капсулы дополнительно обрабатывали 1,6% раствором хитозана с pH=6. Все растворы предварительно стерилизовались с помощью автоклавирования при 110 °С в течение 30 минут. Для дальнейшего хранения микрокапсулы помещались в дистиллированную воду в стеклянную емкость с закрытой крышкой и хранились при комнатной температуре. Сразу после капсулирования титр КОЕ лактобацилл в микрокапсулах, изготовленных из КЖ, составлял $3{,}1*10^7$ КОЕ/г, в микрокапсулах, изготовленных из осажденной биомассы, составлял $1{,}1*10^6$ КОЕ/г. По истечению 3 месяцев при хранении при комнатной температуре титр КОЕ бактерий в микрокапсулах, изготовленных из КЖ, составлял 0 КОЕ/г, в окружающей их дистиллированной воде - $8{,}0*10^4$ КОЕ/мл. В микрокапсулах, изготовленных из осажденной биомассы, - $3{,}0*10^4$ КОЕ/г, в окружающей их дистиллированной воде титр КОЕ -$1{,}0*10^5$ КОЕ/мл.

Таким образом, выбранная методика капсулирования не дала стабильных результатов по титру КОЕ бактерий. Соответственно, необходима дальнейшая доработка технологии микрокапсулирования для повышения сроков стабильности и активности лактобацилл.

Список литературы:

1. Dahiya D., Nigam P.S. The Gut Microbiota Influenced by the Intake of Probiotics and Functional Foods with Prebiotics Can Sustain Wellness and Alleviate Certain Ailments like Gut-Inflammation and Colon-Cancer. Microorganisms.2022; 10(3):665.
2. Teng M., Luo X., Chang J., Yang C., Zhang X., Li L., Liu X., Zhi R., Guo X., Liu X. Engineering encapsulated living bacteria for advanced healthcare management. BiotechnolAdv. 2025;83:108640. doi: 10.1016/j.biotechadv.2025.108640.
3. Naeem H., Shahbaz M., Farooq U., Ahmad T. Development and Characterization of SynbioticMicrobeads for Enhanced Viability of Probiotics for Food Applications. JFoodSci. 2025;90(7):e70390. doi: 10.1111/1750-3841.70390. PMID: 40610194.
4. Какимова Ж.Х., Какимов А.К., Бепеева А.Е., Хуторянский В.В. Капсулированиепробиотиков в гидрофильные полимеры // Биотехнология и общество в XXI веке: сборник статей Международной научно-практической конференции. — Барнаул, 15–18 сентября 2015 года. — Барнаул : Алтайский государственный университет, 2015. — С. 176-179.

Получение холестериноксидаз I и II типа в клетках актинобактерий

Фокина В.В., Карпов М.В., Донова М.В.

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

Ключевые слова: холестериноксидаза, *Mycolicibacterium smegmatis*, *Nocardioides simplex*, рекомбинантный синтез, гетерологичный фермент, секретируемый белок, биоконверсия.

Фермент холестериноксидаза (ХО) трансформирует холестерин в холестенон с образованием перекиси водорода, он востребован в медицине и фармацевтике, а также в сельском хозяйстве, химии и биотехнологии. Наличие ХО описано для аэробных бактерий различного таксономического положения. Зрелые формы ферментов транслоцируются через ЦПМ TAT-зависимой системой транспорта.

Непатогенный быстрорастущий штамм актинобактерий *Mycolicibacterium smegmatis* mc^2 155 относится к удобным хозяйским организмам, поскольку обладает быстрым ростом и отличается высокой частотой трансформации, при этом этот микроорганизм характеризуется высоким геномным содержанием пар Г+Ц, в цитоплазме у *M. smegmatis* содержатся белки теплового шока и другие, индуцированные стрессом белки, способные к улучшению правильной укладки продуцируемых белков и, наконец, цитоплазматическая мембрана и, в частности, внешняя мембрана миколицибактерий имеют уникальный липидный состав, способствующий эффективной биоконверсии стеринов.

Целью настоящей работы являлось конструирование рекомбинантных штаммов *Mycolicibacterium smegmatis*, продуцирующих секретируемые формы холестериноксидаз из актинобактерий *Nocardioides simplex* и *Rhodococcus equi*.

Последовательность, кодирующая полноразмерную форму ХО I типа семейства глюкоза/метанол/холин-оксидоредуктаз была амплифицирована с хромосомной матрицы штамма *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д. ДНК, кодирующая полноразмерную ХО II типа семейства ванилил/алкоголь/оксидаз из *R. equi*, была синтезирована химически.

Последовательности клонированы в плазмидных экспрессионных шаттл-векторах для экспрессии в миколицибактериях, полученные конструкции были перенесены в клетки штамма *M. smegmatis* mc^2 155.

В результате экспрессии гетерологичных генов в клетках рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* культуральная жидкость каждого из рекомбинантов содержала белковые продукты, по своей массе соответствующие зрелым вариантам ХО I и II типов без соответствующих сигнальных пептидов. Биоконверсию холестерина проводили с использованием бесклеточной культуральной жидкости. Образование холестенона детектировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ.

Функциональная активность секретируемых форм рекомбинантных ХО в отношении холестерина была подтверждена фактом обнаружения холестенона. Полученные данные также свидетельствовали, что системы секреции миколицибактерий способны узнавать сигнальные последовательности белков актинобактерий, принадлежащих к другим родам: *Nocardioides* и *Rhodococcus*.

Результаты расширяют знания о бактериальном транспорте белков и открывают перспективы оптимизации продукции рекомбинантных ХО для практического применения.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 122040500054-3.

Кандидатные гены из *Nocardioides simplex*, кодирующие 3α(20β)-гидроксистероиддегидрогеназы

Фуфаева С.Р.[1], Цуриков А. В.[2], Довбня Д.В.[1], Донова М.В.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
sfufaeva@list.ru

Ключевые слова: гидроксистероиддегидрогеназа, короткоцепочечная дегидрогеназа, *Nocardioides simplex.*

Гидроксистероиддегидрогеназы (ГСД) катализируют обратимое превращение гидроксильных групп стероидных соединений в кетогруппы. Все известные ГСД являются НАД(Ф)(Н)-зависимыми оксидоредуктазами. Значительное количество ГСД принадлежит к древнейшему суперсемейству короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз (КЦДР), кодируемых генами, которые присутствуют практически во всех исследованных геномах. Белки КЦДР не содержат металлов в активном центре и имеют длину всего 250 – 300 аминокислот. Субстратная специфичность в пределах суперсемейства разнообразна и варьирует от сахаров до пигментов и стероидов. Известны различные микробные ГСД, в том числе с высокой регио- и стереоспецифичностью к стероидным субстратам, например 20β-ГСД из *Bifidobacterium*, специфичная к гидрокортизону (Doden, Ridlon, 2021). Высокой активностью 20β-ГСД в отношении гидрокортизона обладает также известный штамм-продуцент стероидных 1-дегидроаналогов *Nocardioides simplex* ВКМ Ac-2033Д (Fufaeva с соавт., 2023), однако фермент(ы), осуществляющую данную реакцию, не идентифицированы. Важность изучения 20β-ГСД данного штамма имеет два аспекта. С одной стороны, 20β-ГСД активность является нежелательной в биотехнологии производства стероидных 1-дегидроаналогов, с другой стороны, эту активность можно использовать для получения ценных 20β-гидроксистероидов прегнанового ряда. 20β-Гидроксистероиды прегнанового ряда являются современными синтетическими аналогами природных гормонов рыб, стимулирующими репродуктивные функции и развитие мальков в закрытой аквакультуре.

Короткоцепочечные ГСД имеют консервативный мотив связывания НАД(Ф)(Н) (TGxxxGxG) с укладкой Россмана на *N*-конце, а также консервативные остатки Tyr, Ser, и Lys в каталитическом центре. Пространственная структура в пределах суперсемейства белков КЦДР практически одинакова, при этом аминокислотные последовательности сильно варьируют, что создает определённые трудности в прогнозировании субстратной специфичности.

Ранее полногеномный анализ *N. simplex* (CP009896.1) выявил пять ОРС, имеющих гомологию с аннотированными генами 20β-ГСД (Shtratnikova с соавт., 2016). Нами было выполнено выравнивание аминокислотных последовательностей, соответствующих обнаруженным ОРС с белками бактериальных 20β-ГСД с подтвержденной функцией (ClustalW (Gap Open Penalty: 10, Gap Extension Penalty: 0,05)). Аминокислотные последовательности AIY17335.1, AIY17521.1, AIY17644.1, AIY20132.2 и AIY19232.1 предполагаемых 20β-ГСД из *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д содержат НАД(Ф)(Н) – связывающий домен, а также консервативный активный центр (NSYK/DSYK (Devendran с соавт., 2017). Последовательность AIY20132.2 содержит *N*-концевой домен, предположительно отвечающий за функцию олигомеризации фермента аналогично белку WP_003810233.1 с подтвержденной функцией 20β-ГСД (Devendran с соавт., 2017).

Нами построена филограмма (Jalview и FigTree v4.4, метод NJT), иллюстрирующая эволюционные расстояния между аминокислотными последовательностями известных бактериальных 20β-ГСД и предполагаемых 20β-ГСД из *N. simplex* (рис. 1). Существенные различия между последовательностями известных белков и AIY17644.1 ставит под сомнение наличие активности 20β-ГСД у данного кандидатного белка. Последовательность AIY17521.1 из *N. simplex* эволюционно близка к последовательностям 20β-ГСД из двух штаммов *Streptomyces hydrogenans* с подтвержденной целевой биохимической активностью, что может указывать на аналогичную

функцию белка AIY17521.1. Эволюционное расстояние (Branch time) до ближайшего фермента 20β-ГСД с подтвержденной функцией составило минимальное значение, составившее 318,36. Последовательности AIY17335.1, AIY17521.1 и AIY20132.2 находятся на достаточно близком расстоянии (468 – 599) от белков P69166 и P9WGT0.1 из разных штаммов *M. tuberculosis* и также могут являться 20β-ГСД. Для ОРС, соответствующих последовательностям AIY17335.1, AIY17521.1, AIY20132.2, подобраны пары праймеров и оптимальные условия для амплификации. В дальнейшем будет выполнен функциональный анализ этих белков в клетках *E. coli*.

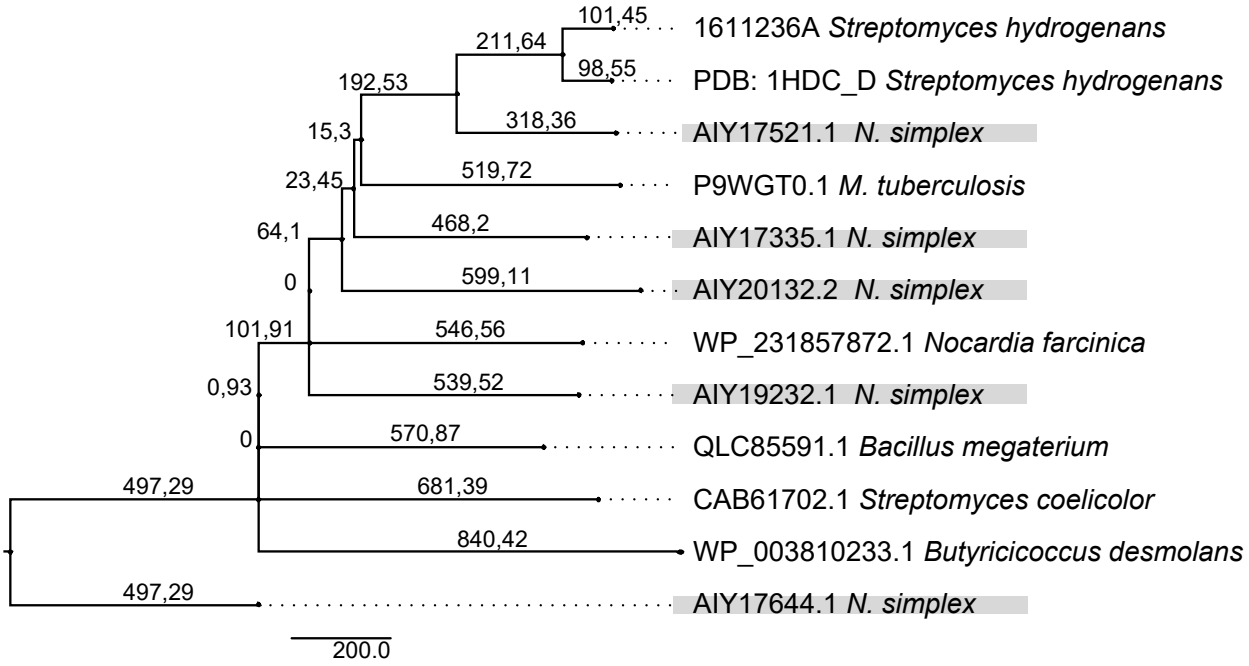


Рис. 1. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей известных и предполагаемых 20β-ГСД. Дерево получено с помощью программного обеспечения FigTree v4.4 с использованием метода ближайших соседей (NJT). Цифрами обозначено эволюционное расстояние между последовательностями (Branch time).

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122040500054-3).

Список литературы:

1. Devendran S., Méndez-García C., Ridlon J.M. Identification and characterization of a 20β-HSDH from the anaerobic gut bacterium *Butyricicoccus desmolans* ATCC 43058 // J Lipid Res. (2017) V. 58(5). P. 916-925.
2. Doden H. L., Ridlon J. M. Microbial hydroxysteroid dehydrogenases: from Alpha to Omega // Microorganisms (2021) V. 24. N. 9(3). P. 469.
3. Fufaeva, S.R., Dovbnya, D.V.; Ivashina, T.V., Shutov, A.A., Donova, M.V. Reconstruction of the Steroid 1(2)-dehydrogenation system from *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D in *Mycolicibacterium* hosts // Microorganisms (2023), V. 11. P. 2720.
4. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Pekov Y.A., Ivashina T.V., Donova M.V. Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D // Curr Genet. (2016) V. 62(3). P.643-56.

Специфичность аккумуляции марганца, железа и неодима бактериями *Sphaerotilus montanus* и *Rhodococcus ruber SiAl*

Хохлова Г.В. [1]***, Короткова Н.А.*** [2]***, Барановская В.Б.*** [2]***, Тихонов К.Г.*** [3]***, Кулаковская Т.В.*** [1]***, Вайнштейн М.Б.*** [1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
[2]ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН
[3]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт фундаментальных проблем биологии РАН)

Ключевые слова: селективная аккумуляция металлов, представители бактерий: *Sphaerotilus montanus* ВКМ В-2519^{T}.

Осаждение металлов из растворов имеет важное значение для очистки вод. В то же время крайне желательна селективная аккумуляция металлов, которая позволит отделять необходимые редкоземельные металлы. Ниже представлены результаты исследования осаждения и аккумуляции марганца, железа и неодима двумя различными представителями бактерий: *Sphaerotilus montanus* ВКМ В-2519^{T}, исходно выделенной из железо-марганцевых отложений, и *Rhodococcus ruber* SiAl, выделенной нами из корродированного силумина. Исследования с этими штаммами проводили в двух принципиально разных видах экспериментов. В одних экспериментах изучали осаждение этими штаммами марганца или железа из растворов в виде фосфатов или фосфорилированного органического комплекса (составы сред и условия экспериментов опубликованы [1]). В других изучали способность *S. montanus* и *R. ruber SiAl* к растворению утилизированных металлических сплавов и последующую аккумуляцию Fe и редкоземельного Nd в биомассе. В экспериментах первого типа, с фосфатами, из образцов биомассы экстрагировали фосфорные соединения растворами $HClO_4$; фосфат определяли с малахитовым зеленым, а в образцах полисахаридов и культуральной жидкости с аскорбиновой кислотой [1]. В экспериментах второго типа анализ содержания железа и неодима в культуральной жидкости и в биомассе проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) с использованием спектрометра ICAP PRO XP (Thermo Electron Corp., США). Величины pH в средах были нейтральными. В ходе экспериментов первого типа выяснилось, что *S. montanus* успешно переводил из раствора в осадок значительные количества марганца (в основном в виде минерального фосфата Mn(II), а также в комплексе с органическим веществом фосфорилированного полисахарида) и накапливал марганец в биомассе, однако, железо выводил из раствора в заметно меньших количествах (Табл. 1).

Табл. 1. Аккумуляция растворенных марганца и железа из среды биомассой бактерий *S. montanus* ВКМ В-2519^{T}.

Штамм	Концентрация в среде, мМ		Концентрация в биомассе, мкМ/г	
	Mn	Fe	Mn	Fe
В-2519^{T}	0	2,0	0,05±0,00	8,3±0,20
В-2519^{T}	2.0	0	216±24	1.09±0,05

В экспериментах второго типа бактерии растворяли металлы из измельченного сплава, содержавшего исходно высокие концентрации железа и неодима (69,85 и 22,44 масс. % соответственно), и при этом аккумулировали металлы в биомассе (Табл. 2). Результаты показали, что металлы практически не накапливались в растворе, но сорбировались / аккумулировались биомассой. Концентрации железа и неодима в биомассе *R. ruber SiAl* на порядок превышали концентрации этих металлов в биомассе *S. montanus*.

Табл. 2. Растворение и аккумуляция металлов биомассой бактерий *S. montanus* ВКМ В-2519^{T} и *R. ruber SiAl* из сплава металлов, содержавшего железо, неодим и празеодим. Средний результат из трех параллельных определений; относительное стандартное отклонение 1-3 %.

Штамм	Концентрация в растворе, мг/л			Концентрация в биомассе, мкг/г		
	Fe	Nd	Pr	Fe	Nd	Pr
В-2519^{T}	1,27	<0,02	<0,03	33,05	3,40	0,50
SiAl	0,55	0,10	<0,03	468,0	82,44	0,70

В целом исследование показало, что бактерии *S. montanus* и *R. ruber SiAl* способны к осаждению различных металлов из растворов и накоплению в биомассе. Однако при этом *S. montanus* в основном выводят из раствора и аккумулируют марганец, но не железо и неодим, тогда как *R. ruber SiAl* является более активным в отношении железа и неодима и менее – в отношении к марганцу. Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать применение *S. montanus* в биофильтрах для осаждения водных сред от избытков марганца, а *R. ruber SiAl* – для селективной аккумуляции железа и неодима. В настоящее время авторы проводят сравнение геномов этих штаммов для выявления генов, ответственных за специфичность микроорганизмов в процессах выделения металлов из растворов.

Список литературы

[1] Khokhlova G., Zvonarev A., Ostroumov V., Tikhonov K., Teplonogova M., Kulakovskaya T., Vainshtein M. Manganese and phosphate removal from culture medium during the growth of the bacterium *Sphaerotilus montanus*. *Folia Microbiol* (2025). https://doi.org/10.1007/s12223-025-01323-y .

Исследование влияния лития на Haloarcula hispanica и Haloferax gibbonsii

Шайкин А.А.[1], Абашина Т.Н.[1], Кумар С.[2], Вайнштейн М.Б.[1]

[1]ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), Пущино
[2]Университет информационных технологий Джайпи, Солан, Индия
shaikin.artem@pbcras.ru

Ключевые слова: галофильные археи; *Haloarcula hispanica*; *Haloferax gibbonsii*; литий; аккумуляция Li.

С увеличением спроса на литий требуется разработка инновационных и экологически безопасных методов его извлечения из первичных и вторичных источников, включая электронные отходы. Ключевой проблемой гидрометаллургических технологий является селективное отделение лития от других элементов. Биосорбция, использующая микроорганизмы для избирательного связывания лития, представляет собой перспективное направление исследований. Этот биотехнологический метод демонстрирует высокую эффективность и экологическую безопасность, что особенно важно в условиях ограниченности природных ресурсов и ужесточения экологических стандартов.

Биосорбция включает адсорбцию ионов металлов на клеточных поверхностях микроорганизмов, внутриклеточное накопление и контролируемое выделение, что значительно повышает степень извлечения лития. Таким образом, данный метод способствует экономической эффективности и экологической устойчивости переработки литиевого сырья.

Целью настоящего исследования было изучение влияния ионов лития на галофильные прокариотические культуры, обладающие способностью выживать в среде с высоким содержанием одновалентных катионов (более 200 г NaCl/л). Исследование имеет потенциал для изучения воздействия лития на прокариотические клетки и разработки методов его извлечения из литийсодержащих гальванических элементов с целью повторного использования.

Для проведения исследования были использованы типовые штаммы галофильных архей из различных родов: *Haloarcula hispanica* (ВКМ В-1755) и *Haloferax gibbonsii* (ВКМ В-1756). Культуры выращивались в питательной среде DSMZ 372 в трех вариациях: с добавлением NaCl или NaCl+LiCl, а также LiCl с концентрацией указанных солей 200 г/л.

Рост культур оценивался в течение семи дней по изменению оптической плотности при длине волны 600 нм. Морфология клеток анализировалась методом световой микроскопии с использованием фазово-контрастного метода.

Экспериментальные результаты показали, что галофильные археи сохраняют жизнеспособность и аккумулируют литий в биомассе при концентрациях ионов лития в диапазоне 14,8-25,2 г Li^+/л. Это свидетельствует о их способности выдерживать высокие концентрации лития и возможности использования для биотехнологической сорбции данного металла из солевых растворов с высокой концентрацией. Уровень аккумуляции лития в биомассе варьировался от 0,9% до 1,6%, что сопровождалось снижением его концентрации в растворе. Процесс аккумуляции лития зависел от следующих факторов: вида штамма архей, наличия ионов натрия в среде и условий освещения (вероятно, за счёт участия родопсина в переносе одновалентных катионов). Аккумуляция ионов натрия в биомассе преимущественно зависела от их концентрации в среде и составляла 6,4-6,5% в сырой биомассе.

Таким образом, галофильные археи представляют собой перспективный биологический объект для разработки эффективных методов биосорбции лития и натрия из высококонцентрированных солевых растворов. Дальнейшие исследования в этой области могут привести к созданию экономически выгодных и экологически чистых технологий для извлечения ценных металлов и очистки промышленных стоков.

Применение амперометрического метода для сравнения химической и биологической коррозии стали бактериями *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Ячкула А.А., Кувичкина Т.Н., Звонарев А.Н.

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

Ключевые слова: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, амперометрический метод, экспресс-метод, биокоррозия, сталь.

Биокоррозия является многофакторным, сложно прогнозируемым явлением. Для ее исследования применяют различные подходы и методы, которые позволяют углубить знания о процессах разрушения стальных конструкций под действием микроорганизмов. Одним из широко известных агентов биологической коррозии металлов являются автотрофные ацидофильные бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* [1]. Эти бактерии способны окислять металлическое и двухвалентное железо и использовать освобождающуюся при этом энергию: белки, кодируемые опероном *rus*, участвуют в переносе электронов от Fe к кислороду [2]. Эти особенности физиологии *A. ferrooxidans* легли в основу нашей работы: оценку вклада бактерий в коррозию стали по потреблению кислорода, измеряемого электрохимическими методами. Такой подход важен потому, что позволяет не только расширить знания о взаимодействии бактериальных клеток с поверхностью металла, но и перспективен для оценки агрессивности штаммов и подбора бактерицидных или биостатических добавок для защиты металлов.

Целью нашей работы было изучение процесса взаимодействия *A. ferrooxidans* с образцом стали. О биоокислении стали при воздействии бактерий и химическом окислении в контрольном варианте судили по потреблению кислорода, измеряемого амперометрическим методом.

Материалы и методы

В экспериментах использован автотрофный штамм *A. ferrooxidans* ВКМ В-3655, предварительно выращенный на минеральной среде, содержавшей Fe^{2+}. Образцом оцинкованной стали служили металлические скрепки (Staff Profit, КНР); задействованная площадь металла в опыте 2 мм^2. О потреблении кислорода судили по изменению величины электрического тока, измеряемого на оборудовании на основе электрода Кларка (Кронос, Россия). Количество биомассы *A. ferrooxidans* в каждом опыте составляло 4 мг. Все опыты проводили в трехкратной повторности. Относительное стандартное отклонение повторяемости (ОСКО) составило 2-5 отн. %. Динамику процесса отслеживали в течение 7 суток. Формирование бактериальной пленки на поверхности окисляемой скрепки оценивали по окончании опытов с применением светового микроскопа AXIO Imager A1 (ZEISS), цифровой фотокамеры AxioCam (ZEISS) и программы AxioVision AC.

Результаты

Результаты экспериментов показали значительное обрастание скрепки бактериальной пленкой уже в течение 7 суток. Рост бактерий на поверхности металла сопровождался потреблением кислорода. В экспериментах со стерильными образцами обнаружено снижение потребления кислорода (вероятно, за счет пассивации поверхности металла пленкой возможных окислов). Величина тока на седьмые сутки по сравнению с первыми в контрольных экспериментах снизилась на 45 нА. В то же время в параллельных экспериментах с биомассой штамма *A. ferrooxidans* ВКМ В-3655 величина тока на седьмые сутки по сравнению с первыми повысилась на 40 нА. Таким образом, амперометрический метод измерения потребления кислорода электрод Кларка может быть применен для оценки взаимодействия «бактерии – металл» и прогнозирования развития коррозионного процесса, а также для оценки эффективности применения антикоррозионных добавок.

По результатам, штамм *A. ferrooxidans* ВКМ В-3655 показал значительный вклад в окисление стали по сравнению с химическим контролем. Важную роль в биоокислении стали играет образование бактериальной пленки на поверхности металла, не допускающей химической пассивации металла.

Список литературы:

1. Кашковский Р. В., Хохлачев Н. С. Микробиологические аспекты коррозионного разрушения подземных трубопроводов // Вести газовой науки. 2022. №1 (50), с. 57-77.
2. Carlos C., Reis F.C., Vicentini R., Madureira D.J., Ottoboni L.M. The rus operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. // Curr Microbiol. 2008, 57(4):375-80. doi: 10.1007/s00284-008-9208-7.