

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Российская академия наук
Сибирское отделение Российской академии наук
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАН
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Институт биохимии и генетики РАН
Иркутская государственная медицинская академия
последипломного образования
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН
Лимнологический институт СО РАН
Общество микробиологов России

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Тезисы докладов
Второй Всероссийской научной конференции
с международным участием

Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г.



УДК 579(063)

ББК 28.4д0

М55

Ответственный редактор

д-р биол. наук Ю. А. Маркова

Редакционная коллегия

д-р биол. наук Л. А. Беловежец

д-р биол. наук Л. Е. Макарова

канд. биол. наук Л. А. Максимова

канд. биол. наук Н. В. Филинова

М55

Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : тезисы докладов Второй Всероссийской научной конференции с международным участием. Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г. / СИФИБР СО РАН ; [отв. ред. Ю. А. Маркова]. – Иркутск : Издательство ИГУ, 2022. – 291 с.

ISBN 978-5-9624-2018-9

В докладах представлены новейшие результаты российских и зарубежных ученых, посвященные современным исследованиям адаптационного потенциала разных видов микроорганизмов (изучение CRISPR/Cas систем, биопленкообразования и др.) и механизмов его формирования. Большое внимание уделяется вопросам возможности управления адаптационным потенциалом микроорганизмов для последующего практического использования в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве.

Издание предназначено для специалистов в области изучения растительно-микробных взаимодействий, медицинской микробиологии, почвенной микробиологии, физиологии и биохимии стресса, молекулярной биологии, генетики и экологии, а также для студентов и аспирантов биологических специальностей высших учебных заведений.

УДК 579(063)

ББК 28.4л0

Mechanisms of microorganisms adaptation to different habitat condition: Proceedings of All-Russian Scientific Conference with International Participation, Irkutsk, Baikal February 28 – March 6, 2022. Irkutsk, Irkutsk State University Publ., 2022, 291 p.

ISBN 978-5-9624-2018-9

© СИФИБР СО РАН, 2022



Ившина Ирина Борисовна

академик РАН, д-р биол. наук, заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного университета

ПРАВИЛА ЖИЗНИ

*Не верьте никому, будь то девяностолетний старец
и трижды академик,
если он скажет, что хоть что-то понимает в том,
как устроена человеческая жизнь.
Никто из нас не знает и не понимает...*

Н. П. Шмелёв

Вряд ли существуют универсальные для всех правила жизни. Но однозначным является то, что главной движущей силой всех процессов выступает время. *Tempus fugit* (лат.). Поэтому важно, как можно раньше понять ценность времени и постараться, не отвлекаясь на соблазны, так распорядиться им, чтобы добиться достойных результатов, а значит успеха в науке, работе, в жизни.

- Исключительная ценность бытия – заниматься желанным делом, обращая на него все силы, интерес и энергию, иметь щедрую поддержку и доброе отношение правильных учителей и наставников, быть благодарным за всякое оказанное добро, никому не отказывать в помощи, если в ней возникает потребность, общаться с вдохновенными и вдохновляющими людьми, уметь жить в одной вере, сохранять достоинство в профессии, наконец, творить без помехи, быть щедрым и независимым.

- Величайшая честь иметь талантливых учеников, помогающих нести груз ответственности за дело, а среди коллег – верных единомышленников-соавторов в профессии, дух наш питающих, с которыми находишь взаимопонимание и на которых всегда можно опереться в трудную минуту.

- Строгая дисциплина в работе и уважение к делу. Сомнение и недовольство собой. Самоконтроль и самокритика. «Ты сам свой высший суд» (Пушкин).

- В жизни важно испытать успех. Опыт показывает, если отдавать себя целиком делу, самозабвенно и одержимо работать, тогда ждет непереносимый успех, и каждая даже небольшая удача будет огромным вознаграждением. Других рецептов нет. Ощущение хорошо сделанной работы – один из смыслов жизни, если не единственный.

- В современной науке (тем более в биологической) ничего нельзя сделать в одиночку. Научные идеи и обобщения «не рождаются в одиноком уме». Актуальная наука может процветать только в сообществе ученых, создать действительно нечто ценное возможно только в условиях активации «чувства кворума» (quorum sensing, коммуникации внутри популяции).

- Современная научно-исследовательская деятельность и работа преподавателя вуза немыслима без научных публикаций результатов труда в профессиональных изданиях в России и за рубежом, без представления материалов на международных и всероссийских конференциях, сопряжена с защитой прав интеллектуальной собственности в виде патентов на полезные модели и новые разработки.

- Сегодня наука становится междисциплинарной, синтез приоритетен во всем. Чтобы вписываться в современный научный процесс, требуется особая культура кооперативного взаимодействия специалистов разных научных дисциплин, успешному партнерству необходимо учиться. Принадлежность к междисциплинарному научному сообществу придает ощущение нужного единства, консолидации и является абсолютным условием противостояния любым опасностям современного мира. Говоря языком биологии, выживает консорциум, формирующийся как защитный механизм (иммунитет), а не множество единичных нередко конкурирующих индивидов.

- Надо бояться глупости. К сожалению, она часто встречается и нередко сильнее ума. Если умный человек зачастую бывает одинок, то глупость всегда найдет «однокашников».

- Не забывать, что у жизни короткая программа, поэтому надо научиться реально оценивать свое время, уметь переключаться и чем дальше, тем глубже соблюдать приемлемый баланс между личной жизнью и работой.

- Следует согласиться с мнением великого русского полководца Михаила Кутузова, который полагал: «Весь вопрос счастья – коллекционировать хорошее, что есть в мире, в душе своей, в других

людях. Но это будет обман, нас возвышающий, скажете вы. Нет, это будет истина, нас спасающая» (Кутузов М. И. Письма. Репринты старинных книг. 1870–1871). Истина, спасающая в условиях кризисов, реформ и модернизаций, лавинообразного потока негативной информации, недостаточного скудного бюджета и отсутствия финансовой стабильности, несправедливой низкой заработной платы, работы в состоянии острого цейтнота и глубочайшего стресса – начиная от неспецифических стресс-индуцированных воздействий и информационных перегрузок до социально-стрессовых расстройств вплоть до угрозы биологическому существованию не только микробиоты (нарушения микробиологического гомеостаза) – жизни человека, на фоне кризиса состояния окружающей среды и суровой короновирусной реальности, в которой оказался мир. Приходится адаптироваться, в конце концов, сопротивляться предлагаемым обстоятельствам, добиваться истинных результатов, растить научные школы и молодую смену.

- Времена меняются, но всегда актуально: «понимать, что справедливо; чувствовать, что прекрасно; желать, что хорошо, – вот цель разумной жизни» (Платон).

Post Scriptum... лучший подарок – это ответ на вопрос. Тем не менее, нелепо было бы думать, что прочтение чьих-то, пусть даже выверенных всей жизнью, Правил сможет как-то повлиять на твой Путь. Каждый выбирает себе Дорогу сам... и здесь важно учиться мысленному и творческому живому Общению...

СОДЕРЖАНИЕ

СЕКЦИЯ 1. МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Муратова А. Ю., Бондаренкова А. Д., Голубев С. Н., Дубровская Е. В., Турковская О. В. Адаптационные возможности азоспирилл в условиях техногенного загрязнения	15
Петрова М. А., Миндлин С. З. Механизмы быстрой адаптации представителей рода <i>Acinetobacter</i>	18

СЕКЦИОННЫЕ ДОКЛАДЫ

Авданина Д. А., Сорокина Е. А., Кукушкина В. И., Жгун А. А. Культивирование мицелиальных грибов, изолированных в Государственной Третьяковской галерее, на стандартных микробиологических средах	21
Бахарева Д. А., Зайцева А. А., Зайцев П. А., Чеканов К. А., Горелова О. А., Лобакова Е. С. Вакуолярные включения зеленой микроводоросли <i>Coelastrella rubescens</i> на свету разной интенсивности	24
Бидюк В. А., Александров А. И. Изучение механизмов клеточной гибели в ответ на инактивацию жизненно важных генов в состоянии покоя и активного деления в клетках дрожжей	26
Бынина М. П., Матосова Е. В. Влияние химических загрязнителей поверхностных вод Берингова и Охотского морей на биоленкообразование <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	28
Вятчина О. Ф., Адамович С. Н., Джиев Ю. П., Рубаненко Н. А., Оборина Е. Н., Григорьева А. С., Арефьева Н. А., Портная Я. А., Злобин В. И. Сравнительная оценка ростостимуляции штамма <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> 7-14 кс атрановыми соединениями	32
Данилова О. А., Януцевич Е. А., Кочкина Г. А., Терёшина В. М. Роль мембранных липидов и осмолитов в адаптации психротолерантного мицелиального гриба <i>Mucor</i> sp.	35
Десницкий А. Г. О роли адаптаций к условиям внешней среды в распространении и эволюции зеленых микроводорослей рода <i>Volvox</i>	37
Доолоткельдиева Т. Д., Бектурганова Б. Ш., Бобушева С. Т. Бактериальные сообщества долины Сон-Куль Кыргызстана и их адаптация к низкотемпературным, высокогорным условиям	40

Еникеев А. Г., Семенов А. А. Эндогенные фталаты в растениях и микроорганизмах – инструмент защиты или оружие нападения?	43
Зацаринная Е. А., Гаськова А. С., Колупаева Н. В., Колупаева Л. В. Сравнительный анализ антибиотикорезистентности энтеробактерий, выделенных из поверхностных водных объектов разных природно-климатических зон	45
Злобин И. В., Зайцева Ю. В., Соколов М. Н., Маракаев О. А. Поиск и идентификация штаммов бактерий, обладающих механизмом Quorum Quenching	48
Йылдырым Е. А., Грозина А. А., Ильина Л. А., Филиппова В. А., Лаптев Г. Ю., Пономарева Е. С., Дубровин А. В., Молотков В. В., Тюрина Д. Г., Калиткина К. А. Изменение состава кишечного микробиома цыплят-бройлеров под воздействием T-2 токсина	50
Кашеварова Н. М., Ткаченко А. Г. Роль алармона (P)PPGPP в регуляции образования индола в зависимости от содержания глюкозы в культуре <i>Escherichia coli</i>	53
Козлова И. А., Федосеева Е. В., Терехова В. А. Стимуляция пигментообразования в мицелии грибов под воздействием тяжелых металлов	56
Кокорева А. С., Гесслер Н. Н., Исакова Е. П., Дерябина Ю. И. Изменение физиологических характеристик дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> в ходе длительного культивирования	59
Кононова Л. И., Лемкина Л. М., Коробов В. П. Анализ чувствительности к антибиотикам клинических изолятов коагулазонегативных стафилококков	61
Кудинова А. Г., Петрова М. А. Повышенное образование покоящихся ультрамикрoформ бактерий как адаптация к экстремальным условиям антарктических почв	64
Маслова О. А., Петрова М. А. Роль мега-плазмид в адаптации бактерий рода <i>Acinetobacter</i>	67
Никонова А. А., Майкова О. О., Ханаев И. В., Глызина О. Ю. Адаптация байкальских губок как сложного симбиотического сообщества животных и микроорганизмов к искусственным условиям обитания	69
Никонова А. А., Шишлянников С. М., Оболкин В. А., Воробьева С. С. Неспецифическая адаптационная реакция байкальского фитопланктона в ответ на антропогенную нагрузку	72
Пономарева Е. С., Филиппова В. А. Отличия состава микробиоты рубца северного оленя в зависимости от ареала обитания	75
Рубаненко Н. А., Вятчина О. Ф., Джигоев Ю. П., Сухов Б. Г., Григорьева А. С., Степаненко Л. А., Арефьева Н. А., Макарова А. Э., Портная Я. А., Злобин В. И. Влияние природных полисахаридов арабиногалактана и каррагинана на рост <i>Bacillus thuringiensis</i>	78

Русакова Д. А., Сидоренко М. Л. Ферментативная адаптация психрофильных микроорганизмов к факторам окружающей среды.....	81
Саляев Р. К., Рекославская Н. И. Действие «ранних» белков E2, E6 и E7 папилломавируса высоко-канцерогенного типа ВПЧ16 на раковые клетки HeLa	84
Сысоев А. А., Сысоева И. В., Данилова О. Н. Механизмы адаптации различных культур морских планктонных водорослей к негативным факторам среды	87
Терёшина В. М., Януцевич Е. А., Данилова О. А., Бондаренко С. А. Роль мембранных липидов в адаптации микромицетов-экстремофилов	89
Успанова Д. М., Мурзина Ю. И., Коробейникова А. С., Глинская Е. В., Нечаева О. В. Адаптация микроорганизмов-нефтедеструкторов к физико-химическим факторам внешней среды	92
Федосеева Е. В., Данилова О. А., Януцевич Е. А., Терешина В. М., Терехова В. А. Влияние солей тяжелых металлов на рост, спорогенез, липидный и осмолитный профили меланизированного гриба <i>Alternaria alternata</i>	95
Фролов Е. Н., Мальцева А. И., Гололобова А. В., Лебединский А. В., Кубланов И. В. Сульфатредуцирующие прокариоты термальных источников Курило-Камчатского региона	98
Хаова Е. А., Ткаченко А. Г. Регуляторный эффект полиаминов на транскрипцию генов адаптации к стационарной фазе <i>Escherichia coli</i> ...	101
Цой Е. А., Фисунов Г. Ю., Евсютина Д. В., Манувера В. А., Ведяйкин А. Д., Варижук А. М., Цветков В. Б., Говорун В. М. Транскрипционный фактор WhiA образует петлю обратной связи между энергетическим метаболизмом и трансляцией у бактерий с редуцированным геномом	104
Цыганов И. В., Ткаченко А. Г. Участие полиаминов в регуляции скольжения <i>Mycolicibacterium smegmatis</i> в присутствии антибиотиков	106
Чеканов К. А., Зайцева А. А., Зайцев П. А., Бахарева Д. А., Горелова О. А., Кочкин Д. В., Лобакова Е. С. Фотозащитная роль оптического экранирования в клетках зеленой микроводоросли <i>Coccolastrella rubescens</i>	109
Шапиро Т. Н., Лобакова Е. С., Манучарова Н. А. Экспрессия гена алканмонооксигеназы <i>alkB</i> у штаммов углеводородоокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов	111

СЕКЦИЯ 2. АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ
В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА (ЖИВОТНОЕ, РАСТЕНИЕ, ЧЕЛОВЕК)

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Ганнесен А. В., Мартьянов С. В., Неволina Е. Д., Овчарова М. А., Дювенжи Е. В., Данилова Н. Д., Киселева А. А., Гераськина О. В., Журина М. В., Шелкунов М. И., Зиганьшин Р. Х., Терешина В. М., Януцевич Е. А., Данилова О. А., Феофанов А. В., Здоровенко Э. Л., Бочкова Е. А., Плакунов В. К. Взаимодействие микроорганизмов-комменсалов кожи и систем гуморальной регуляции человека	114
Гоголев Ю. В., Гоголева Н. Е., Осипова Е. В., Коннова Т. А., Хамо Х., Балкин А. С. Метатраскриптомика и парная транскриптомика патосистем	117

СЕКЦИОННЫЕ ДОКЛАДЫ

Басалаева Д. Л., Роденко К. А., Никельшпарг М. И., Евстигнеева С. С., Глинская Е. В. Адаптация бактерий <i>Bacillus velezensis</i> к условиям обитания в растительном организме	118
Борисенко А. Ю., Джиоев Ю. П., Степаненко Л. А., Перетолчина Н. П., Арефьева Н. А., Тетерина Г. А., Портная Я. А., Карноухова О. Г., Симонова Е. В., Ракова Е. Б., Саловарова В. П., Семинский И. Ж., Злобин В. И. Сравнительный биоинформационный анализ структур CRISPR-Cas систем в геномах трех штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> и их роль в защите от бактериофагов	121
Бурлак В. А., Федорова В. С., Кириленко К. М., Воробьев Р. С., Коханенко А. А., Артемов Г. Н. Микробиом кишечника комаров-переносчиков дирофилярий	123
Васильченко А. С., Пошвина Д. В., Сидоров Р., Яшников А. В., Рогожин Е. А., Васильченко А. В. Экстракт коры дуба (<i>Quercus cortex</i>) снижает вирулентность <i>Pectobacterium carotovorum</i> через quorum sensing-зависимые механизмы	126
Гоголева Н. Е., Балкин А. С., Червяцова О. Я., Кузьмина Л. Ю., Шагимарданова Е. И., Гоголев Ю. В. Микробные обрастания карстовых пещер: адаптация к олиготрофным афотическим условиям обитания	128
Дымнич А. С., Белова М. Г., Яшина А. В., Глинская Е. В. Адаптация ассоциативных бактерий злаковых культур к условиям обитания в растительном организме	130
Дунаева М. Н., Панкратов Д. В., Суровый А. Л., Цыганков В. Ю., Фоменко П. В., Шелканов М. Ю., Беланов М. А. Микробиологический пейзаж в очаге эпизоотии с высокой смертностью среди тупиков-носорогов <i>Cerorhinca monocerata</i>) на юге Приморского края в июле 2021 г.	133

Жгун Е. С., Олехнович Е. И., Покровская Е. В., Шестакова Е. А., Федюшкина И. В., Конанов Д., Шестакова М. В. Ильина Е. Н. Трансплантация фекальной микробиоты в формате комплексной терапии диабета: вопросы приживаемости микроорганизмов	135
Колубако А. В., Шруб Е. В., Бадалян О. А., Николайчик Е. А. Молекулярные механизмы распознавания <i>Pectobacterium versatile</i> растениями семейства пасленовые	137
Курлюк Э. В., Суздальцева А. В. Чувствительность к антибиотикам коагулазонегативных стафилококков – симбионтов кожи человека	140
Ладанова М. А., Новикова О. Б. О создании препарата специфической профилактики мастита коров	143
Макарова Л. Е., Маркова Ю. А., Каропова М. С., Мориц А. С., Захарова О. В. Исследования взаимодействий эндофитных бактерий растений гороха с ризосферными бактериями в прикорневой зоне	146
Малахова Т. В., Мурашова А. И., Лобко В. В., Пименов Н. В. Микробные сообщества мелководных струйных метановых газодельдений в прибрежных районах Крыма	149
Михайловская В. С., Артамонова О. А., Жданова И. Н., Кузнецова М. В. Распространенность детерминант патогенности среди штаммов <i>Escherichia coli</i> , выделенных от здорового крупного рогатого скота в хозяйствах Пермского края	152
Николайчик Е. А., Вычик П. В., Крук А. Н., Дюбо Ю. В., Колубако А. В. Транскрипционная регуляция взаимодействия <i>Pectobacterium</i> spp. с растениями-хозяевами	155
Новикова О. Б., Терлецкий В. П., Ладанова М. А. Генотипирование методом ДРИМ <i>Escherichia coli</i> с целью контроля эпизоотической ситуации в отношении колибактериоза в птицеводстве	157
Песоцкая К. Ю., Лагоненко А. Л., Евтушенков А. Н. Конструирование и характеристика делеционного мутанта <i>Erwinia amylovora</i> по гену транскрипционного регулятора SlyA	160
Петрушин И. С., Гутник Д. И., Пушмина Е. О. Анализ признаков адаптации к среде обитания бактерий семейства <i>Flavobacterium</i> методами сравнительной геномики	163
Потехин А. А., Яковлева Ю. А., Балкин А. С., Пенькова Е. В., Чекрыгин С. А., Мелехин М. С., Корсун Д. А., Лебедева Н. А. Адаптации и коэволюция партнеров в системах внутриядерных симбиозов между инфузориями и бактериями	165
Тетерина Г. А., Арефьева Н. А., Носова А. И., Джигоев Ю. П., Юринова Г. В., Приставка А. А., Борисенко А. Ю., Степаненко Л. А., Портная Я. А., Саловарова В. П., Злобин В. И. Поиск и анализ структур CRISPR-Cas систем в геномах <i>Limosilactobacillus fermentum</i> и их фаговых антагонистов методами биоинформатики	167

Фисунов Г. Ю., Евсютина Д. В., Семашко Т. А., Цой Е. А., Говорун В. М. Природное редактирование ДНК для ухода от иммунного ответа у <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	170
Хомяков Ю. Н., Хомякова Т. И., Магомедова А. Д., Мхитаров В. А. Оценка эффекта действия кисломолочного продукта (кумыс) на возможность предупреждения транслокации при антибиотик-индуцированном дисбиозе у мышей –гибридов F1	171
Хомякова Т. И., Федорова А. В., Магомедова А. Д., Хомяков Ю. Н. Выбор модели для исследования бактериальной транслокации в организме беременных как этиологического фактора развития инфекционной патологии у новорожденных	174
Хомякова Т. И., Хомяков Ю. Н., Мхитаров В. А., Алешкин А. В., Зулькарнеев Э. Р., Магомедова А. Д. Оценка превентивного эффекта перорального применения бактериофагов при антибиотик-индуцированной транслокации бактерий из кишки матери в легкие потомства	177
Черепанова М. А., Чоглокова А. А., Борисов Б. А., Митина Г. В. Полиморфизм грибов <i>Lecanicillium</i> и <i>Akanthomyces</i> (Ascomycota, Нуросcreales, Cordycipitaceae), выделенных из насекомых и ржавчинных грибов	180
Шашков Н. А., Курчак Н., Орлова О. В., Кичко А. А., Пинаев А. Г., Андронов Е. Е. Почвенный микробиом как экологический индикатор: динамика микробиома придорожных почв под действием противогололедных смесей	182

СЕКЦИЯ 3. БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КАК ОДНА
ИЗ ФОРМ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Маркова Ю. А., Беловежец Л. А., Мориц А. С. Фенотипическая резистентность <i>Rhodococcus Qingshengii</i> VKM Ac-2784D	186
--	-----

СЕКЦИОННЫЕ ДОКЛАДЫ

Вершинина З. Р., Лавина А. М., Чубукова О. В., Хакимова Л. Р., Баймиев А. Х. Ризобии с измененной экспрессией генов-регуляторов биосинтеза экзополисахаридов в ассоциативных симбиозах	188
Воропаева Н. М., Ситникова К. О., Сухорева М. В., Сухарева Е. С., Белькова Н. Л. Стратегии выживания под воздействием дезинфицирующих средств с разным активным компонентом у клинически значимых штаммов условно патогенных бактерий	191
Максимова Л. А. Внутривидовой полиморфизм среди диких штаммов <i>Rhizobium radiobacter</i> и <i>Rhizobium rhizogenes</i> по признаку биопленкообразование	194

Масленникова И. Л., Некрасова И. В., Starcic Erjavec M., Кузнецова М. В. Взаимодействие факторов врожденного иммунитета с биопленками, образованными уропатогенными штаммами <i>Escherichia coli</i> с разным патогенным потенциалом	197
Матосова Е. В. Формирование биопленки <i>Salmonella typhimurium</i> с представителями кишечной микрофлоры <i>in vitro</i>	200
Миронова А. В., Федорова М. С., Тризна Е. Ю., Каюмов А. Р. Действие внеклеточных метаболитов <i>Staphylococcus aureus</i> в отношении бактериальных биопленок	203
Немченко У. М., Ситникова К. О., Белькова Н. Л., Григорова Е. В., Воропаева Н. М., Сухорева М. В., Сухарева Е. С., Савилов Е. Д. Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	206
Степанов А. А., Васильченко А. С. Влияние 2,4-диацетилфлюороглюцинола на биопленкообразование <i>C. Albicans</i>	209

СЕКЦИЯ 4. ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Беловежец Л. А., Безаргикова К. У., Ганенко Т. В., Александрова Г. П., Самульцев Д. О. Поиск новых агентов для септирования древесины	211
Граскова И. А. Нанокompозиты как эффективный и безопасный способ борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений	214
Жгун А. А., Потапов М. П., Карпова Н. В., Ядерец В. В., Кардонский Д. А. Трансформация стероидов грибами-деструкторами темперной живописи, изолированными в Государственной Третьяковской галерее	217

СЕКЦИОННЫЕ ДОКЛАДЫ

Авданина Д. А., Кишковская С. А., Танащук Т. Н., Иванова Е. В., Шаламитский М. Ю., Загоруйко В. И., Равин Н. В., Марданов А. В., Эльдаров М. А. Взаимосвязь полиморфизма гена <i>AFTI</i> и <i>FRE-FIT</i> кластера с фенотипической вариабельностью гомеостаза железа у дрожжей сахаромисцетов-продуцентов вина типа «Херес» ..	220
Арефьева Н. А., Джиоев Ю. П., Борисенко А. Ю., Степаненко Л. А., Саловарова В. П., Юринова Г. В., Приставка А. А., Тетерина Г. А., Вятчина О. Ф., Маркова Ю. А., Злобин В. И. Поиск и анализ сайтов и структур CRISPR-Cas систем в геномах плазмид <i>Bacillus thuringiensis</i> и их фаговых антагонистов как перспективных препаратов таргетной фаготерапии	223

Бабусенко Е. С., Киенская К. И., Клейменова Е. А., Крисанова В. А., Буторова И. А. Бактерии <i>Ochrobactrum ciceri</i> – продуцент ПАВ	226
Бажутин Г. А., Тюмина Е. А., Ившина И. Б. Адаптация родококков к токсическому воздействию фармполлутанта ибупрофена	228
Бычкова А. А., Зайцева Ю. В., Маракаев О. А. Разработка тест-системы для быстрого скрининга фосфатмобилизирующих бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	230
Воробейков Г. А. Действие ассоциативных ризобактерий (PGPR) на растения в зависимости от дозы минерального азота	232
Гавришина И. А., Куварина А. Е., Георгиева М. Л., Рогожин Е. А., Садыкова В. С. Алкалофильные грибы рода <i>Emericellopsis</i> – продуценты антимикробных пептидов эмерициллипсидов, активных в отношении патогенных грибов с множественной резистентностью	235
Герасимчук А. Л., Ивасенко Д. А., Касимова А. А., Франк Ю. А. Липофильные бактериальные штаммы из донных осадков реки Обь, перспективные для промышленных биотехнологий	238
Гольщева А. А., Литвиненко Л. В., Ившина И. Б. Использование адаптационного потенциала устойчивости актинобактерий рода <i>Rhodococcus</i> к хлориду ртути в зависимости от условий культивирования	241
Гурина Е. В., Васильченко А. С. Исследование антимикробной активности глиотоксина, продуцируемого <i>Aspergillus fumigatus</i> MX59	244
Демьянкова М. В., Ефименко Т. А., Глухова А. А., Ефременкова О. В. Бактериальные сообщества из гнезд черных садовых муравьев	246
Джиоев Ю. П., Борисенко А. Ю., Степаненко Л. А., Арефьева Н. А., Портная Я. А., Перетолчина Н. П., Маркова Ю. А., Стрекаловская Е. И., Семинский И. Ж., Злобин В. И. Поиск и анализ локусов и структур CRISPR/Cas систем в геноме штамма фитопатогена <i>Agrobacterium Fabrum</i> str.C58 посредством методов биоинформатики	248
Дилбарян Д. С., Васильченко А. С. Гомолог макролактина и липопептиды определяют потенциал использования <i>Bacillus velezensis</i> X-ВЮ-1 в защите растений	251
Доманская О. В., Яшников А. В., Дилбарян Д. С., Васильченко А. С. Биотехнологический потенциал <i>Bacillus</i> spp. из мерзлых пород для устойчивого растениеводства в условиях холодного климата	253
Думина М. В., Жгун А. А., Покровская М. В., Александрова С. С., Жданов Д. Д., Соколов Н. Н., Эльдаров М. А. Новая L-аспарагиназа из гипертермофильной археи <i>Thermococcus sibiricus</i>	255

Ефименко Т. А., Якушев А. В., Карабанова А. А., Глухова А. А., Демьянкова М. В., Васильева Б. Ф., Ефременкова О. В. Антибиотические свойства бактерий, ассоциированных с тропическими мнотрофными грибами (Вьетнам)	258
Ильина Л. А., Пономарева Е. С. Биотехнологический потенциал штамма <i>Bacillus velezensis</i> выделенного из рубца северного оленя ..	259
Калинович А. Е., Татарников С. А., Уланская А. В. О внедрении технологий микробиологической ремедиации нефтезагрязненных грунтов	262
Кокколова Л. М., Гаврильева Л. Ю., Степанова С. М. Биологически активные средства из штаммов нематофаговых грибов <i>Athrobotrys oligospora</i> для обеззараживания окружающей среды в условиях Якутии	264
Кузнецова В. А., Зубова К. В., Каневский М. В., Глинская Е. В., Глуховской Е. Г. Формирование монослоев лентгмиора из нативных фосфолипидов, выделенных из бактерий <i>E. coli</i> K-12	266
Лебедев В. Н. Особенности влияния ассоциативных ризобактерий на капустные культуры при нормальном увлажнении и почвенной засухе	269
Маградзе Е. И. Особенности количественной оценки накопления биомассы стрептомицетов на молочной сыворотке из-за склонности к образованию биопленки при разработке бактериального удобрения ..	272
Мориц А. С., Петрушин И. С., Маркова Ю. А. Антагонизм <i>Rhodococcus qingshengii</i> VKM Ac-2784D по отношению эндо- и ризосферным бактериям картофеля сорта Луговской	274
Николаев Ю. А., Эль-Регистан Г. И., Демкина Е. В., Лойко Н. Г., Борзенков И. А., Иванова А. Е., Канапацкий Т. А., Перминова И. В., Константинов А. И., Воликов А. Б., Хрептугова А. Н., Близнец И. В. Новые биоконструктивные материалы для биоремедиации почв и вод от нефтепродуктов	276
Степаненко Л. А., Борисенко А. Ю., Сухов Б. Г., Конькова Т. В., Джиоев Ю. П., Злобин В. И. Технология поиска и анализа CRISPR-Cas систем в геноме <i>Klebsiella pneumoniae</i> как платформа создания персонализированной фаготерапии	278
Субботин А. М., Петров С. А., Маркевич Т. В., Мальчевский В. А., Ренёв Н. О. Изучение биопотенциала микроорганизмов, выделенных из обводненных мерзлых пород	281
Чайка Н. Я., Режепова А. А., Ахметов Л. И., Пунтус И. Ф., Петриков К. В., Филонов А. Е. Особенности роста и продукции биоПАВ психротрофного штамма-нефтедеструктора <i>Rhodococcus erythropolis</i> F2-2 при культивировании на разных субстратах в условиях низкой температуры	284
Авторский указатель	287

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АЗОСПИРИЛЛ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

А. Ю. Муратова, А. Д. Бондаренкова, С. Н. Голубев
Е. В. Дубровская, О. В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН), Саратов
e-mail: muratova_a@ibppm.ru

Азоспириллы – азотфиксирующие бактерии, природные ассоцианты многих дикорастущих и культурных трав, произрастающих по всему миру. Эти бактерии демонстрируют широкое распространение, обитая в водных и почвенных средах в различных климатических условиях – тропических, субтропических, умеренных и даже антарктических [Eckford et al., 2002; Reis and Baldani, 2015]. Почти все известные представители семейства Rhodospirillaceae, включая род *Azospirillum*, встречаются в водных средах обитания [Wisniewski-Dyé et al., 2011]. Эволюционно азоспириллы перешли от водного существования к наземному тогда же, когда на суше появились сосудистые растения. Секвенирование показало, что почти половина генома *Azospirillum* была приобретена в результате горизонтального переноса генов от других наземных бактерий. Большинство горизонтально приобретенных генов кодируют функции, которые имеют решающее значение для адаптации бактерий к условиям существования. В настоящее время большинство видов азоспирилл выделены из корневой зоны сухопутных растений. Чтобы колонизировать среду

своего обитания, азоспириллы справляются с различными условиями окружающей среды. Гибкий метаболизм этих бактерий позволяет им приспосабливаться и выживать в конкурентной среде ризосферы. Способность использовать для роста разнообразные по химической структуре компоненты корневых выделений (органические кислоты, углеводы, фенольные соединения), синтезировать и акцептировать сигнальные молекулы позволяет представителям рода *Azospirillum* активно взаимодействовать с растениями, поддерживая их рост и собственную популяцию. Азоспириллы диазотрофны и способны к азотфиксации в микроаэрофильных условиях дефицита азота, что характерно для эндоризосферы. Пластичность микробного генома позволяет им осуществлять переход от подвижного состояния свободных клеток к формированию биопленок [Mata et al., 2018] при колонизации корней растений, и даже покоящихся цистоподобных форм – при неблагоприятных условиях, например, вызванных засухой и/или ограничением питательных веществ [Мулюкин и др., 2009]. Несомненно, указанные выше адаптационные возможности позволяют азоспириллам выживать и в условиях техногенного загрязнения окружающей среды, о чем свидетельствует ряд опубликованных данных о присутствии азоспирилл в загрязненных почвах [Eckford et al., 2002; Ojeda-Morales et al., 2016].

Загрязнение природных и хозяйственных объектов органическими и неорганическими поллютантами, среди которых большую часть занимают тяжелые металлы и нефтяные углеводороды, является одной из постоянных и глобальных экологических проблем. Это создает серьезную угрозу для окружающей среды, продовольственной безопасности и здоровья человека из-за канцерогенного и мутагенного воздействия указанных загрязнителей на людей, животных и растения. Среди многочисленных разработанных методов очистки почвы от загрязнителей приоритетное место занимают биотехнологии – использование жизнедеятельности микроорганизмов, грибов и растений для восстановления нарушенных загрязнением природных объектов. В этом аспекте хорошо известные свойства азоспирилл как стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR) и выявленные, но значительно менее изученные их свойства как детоксикантов наряду с широкими адаптационными возможностями, делают представителей рода *Azospirillum* перспективными кандидатами как для самостоятельного использования, так и в сочетании с другими организмами в технологиях био- и фиторемедиации.

Результаты метагеномного анализа таксономического разнообразия микроорганизмов ризосферной и неризосферной, загрязненной и

незагрязненной почв показали, что присутствие растений, так же как и углеводородное загрязнение оказывают стимулирующий эффект на разнообразие и обогащенность микробных сообществ представителями семейства Rhodospirillaceae, к которому относятся азоспириллы. Полученные данные подтверждают целесообразность проведения более глубоких исследований по взаимодействию азоспирилл с техногенными загрязнителями.

С использованием уникальных ресурсов Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>), поддерживающей крупный фонд азоспирилл [Турковская и Голубев, 2020], в течение последних двух десятилетий проводятся исследования по изучению взаимодействия бактерий рода *Azospirillum*, с приоритетными загрязнителями окружающей среды – тяжелыми металлами, нефтяными углеводородами, включающими полициклические ароматические углеводороды, гербицидами. Впервые охарактеризована способность азоспирилл подвергать деградации сырую нефть. Проводится исследование метаболизма (определение промежуточных продуктов и вовлеченных ферментов) полициклических ароматических углеводородов у коллекционных штаммов. Отобраны штаммы азоспирилл, проявляющие устойчивость к тяжелым металлам (цинку, меди, кадмию и никелю). Изучается устойчивость этих бактерий к присутствию в окружающей среде гербицидов различных классов (органофосфонатов, имидазолинонов и сульфонилмочевин). Большинство поддерживаемых коллекционных штаммов азоспирилл охарактеризовано по способности стимулировать рост растений. Выявление экологически значимых свойств у коллекционных штаммов позволило в вегетационных и полевых экспериментах показать перспективность использования азоспирилл как в качестве самостоятельного интродуцента, так и в сочетании с растениями и высшими грибами, для восстановления почв, нарушенных загрязнением углеводородами и тяжелыми металлами. Проведенные исследования подтверждают адаптационный и детоксикационный потенциал бактерий рода *Azospirillum* в условиях техногенного загрязнения окружающей среды.

Литература

Eckford R., Cook F. D., Saul D., Aislabie J., Foght J. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated antarctic soils // Applied and Environmental Microbiology. 2002. Vol. 68, N 10. P. 5181–5185.

Mata A. R., Pacheco C. M., Cruz Pérez J. F., Sáenz M. M., Baca B. E. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes // BMC Microbiology. 2018. Vol. 18, N 1. P. 20

Ojeda-Morales M. E., Domínguez-Domínguez M., Hernández-Rivera M. A., Zavala-Cruz J. Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites // *Water, Air, and Soil Pollution*. 2015. Vol. 226. P. 401.

Reis V., Baldani V. L. D. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria // *Handbook for Azospirillum*. 2015. Vol. 10. P. 978–983.

Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L. O., Wui-chet K., Hurst G. B., McDonald W. H., Robertson J. S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand Ph., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A. H., González V., Mavingui P., Zhulin I. B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // *PLOS Genet*. 2011. Vol. 7 (12).

Мулюкин А. Л., Сузина Н. Е., Погорелова А. Ю., Антонюк Л. П., Дуда В. И., Эль-Регистан Г. И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // *Микробиология*. 2009. Т. 78, № 1. С. 42–51.

Турковская О. В., Голубев С. Н. Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: значение для исследования растительно-бактериальной ассоциативности // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020. Т. 24, № 3. С. 315–324.

МЕХАНИЗМЫ БЫСТРОЙ АДАПТАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ACINETOBACTER*

М. А. Петрова, С. З. Миндлин

Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
e-mail: petrova@img.ras.ru, mindlin@img.ras.ru

Штаммы *Acinetobacter* (*A.*) представляют особый интерес в связи с огромным разнообразием мест их обитания и множеством обнаруженных у них метаболических способностей. Штаммы *A.* повсеместно встречаются в почвах, ризосфере растений и на их поверхности. Многие виды живут в окружающей среде и одновременно являются комменсалами и/или патогенами человека, животных и насекомых. Также среди представителей *A.* имеются штаммы способные к эффективной деградации углеводов штаммы, живущие в местах разлива нефти [Touchon et al., 2014]. Наиболее изученным видом *A.* является патоген человека *A. baumannii* – возбудитель внутрибольничных инфекций, штаммы которого чаще всего обладают исключительно широкой множественной лекарственной устойчивостью [Salgado-Camargo et al., 2020]. В последние годы благодаря развитию и широкому применению технологий NGS получены данные, проливающие свет на механизмы, обеспечивающие удивительную пластичность штаммов *A.* Было обнаружено, что подавляющее большинство штаммов *A.* содержат многочисленные как мелкие, так и крупные

плазмиды [Mindlin et al., 2020]. В частности, были обнаружены конъюгативные мега-плазмиды, обеспечивающие активный горизонтальный перенос одновременно большого количества адаптивных генов [Mindlin et al., 2021].

При сравнении геномов древних штаммов *A. lwoffii*, сохранных в вечной мерзлоте, и современных штаммов этого вида мы не обнаружили никаких существенных различий в последовательностях хромосом, которые отличали бы штаммы вечной мерзлоты от современных штаммов, в том числе и клинических [Rakitin et al., 2021]. А вот сравнение древних природных плазмид, обнаруженных в штаммах *A. lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых отложений, с современными плазмидами позволило ясно проследить процессы адаптации и показало, что плазмиды служат основной платформой для постоянного обмена генетическим материалом, хотя степень участия плазмид в приобретении адаптационных генов у штаммов *A.* разных видов может быть разной [Mindlin et al., 2016; Rakitin et al., 2021]. Приобретение плазмидами новых генов и утрата участков, потерявших свое значение в приспособленности к новой среде обитания, происходит при активном участии различных мобильных элементов (IS-элементов, транспозонов, интегронов, умеренных бактериофагов), а также различных систем рекомбинации [Mindlin et al., 2020, 2021].

Кроме того, в ходе эволюции у штаммов рода *A.* возникли собственные уникальные механизмы горизонтального переноса плазмидных генов. Например, у представителей рода *A.* в горизонтальном переносе различных дополнительных плазмидных генов активно задействована клеточная система сайт-специфической рекомбинации XerC/XerD, за счет формирования особого типа мобильных генетических элементов, фланкированных *dif*-подобными сайтами [Mindlin et al., 2019].

Таким образом, у штаммов *A.* на плазмидах постоянно происходит сборка новых комбинаций генов. В этом процессе у *A.* задействованы не только механизмы, присущие другим бактериям, но и имеется арсенал своих собственных. Это позволяет штаммам *A.* быстро приобретать гены, необходимые для приспособления к условиям среды. Для клинических штаммов это преимущественно гены устойчивости к различным антибиотикам, а для природных – опероны устойчивости к различным тяжелым металлам и другим стрессовым факторам окружающей среды. Сами плазмиды способствуют быстрому распространению среди штаммов *A.* тех генов, которые необходимы для успешного выживания в конкретных условиях.

Таким образом, мы пришли к заключению, что быстрая адаптация к самым различным местам обитания представителей рода *Acinetobacter* в значительной мере их плазмидами, хотя у разных видов этот вклад, очевидно, может быть разным.

Литература

Mindlin S., Beletsky A., Mardanov A., Petrova M. Adaptive *dif* modules in permafrost strains of *Acinetobacter lwoffii* and their distribution and abundance among present day *Acinetobacter* strains // *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. Art. 632.

Mindlin S., Petrenko A., Kurakov A., Beletsky A., Mardanov A., Petrova M. Resistance of ancient and modern *Acinetobacter lwoffii* strains to heavy metals and arsenic revealed by genome analysis // *BioMed Research International*. 2016. Art. 3970831.

Mindlin S., Beletsky A., Rakitin A., Mardanov A., Petrova M. *Acinetobacter* plasmids: diversity and Development of classification strategies. *Front Microbiol*. 2020. Vol. 11: Art. 588410.

Rakitin A., Ermakova A., Beletsky A., Petrova M., Mardanov A., Ravin N. Genome Analysis of *Acinetobacter lwoffii* Strains Isolated from Permafrost Soils Aged from 15 Thousand to 1.8 Million Years Revealed Their Close Relationships with Present-Day Environmental and Clinical Isolates // *Biology (Basel)*. 2021. Vol. 10. Art. 871.

Salgado-Camargo A., Castro-Jaimes S., Rosa-Maria Gutierrez-Rios R.-M., Lozano L., Altamirano-Pacheco L., Silva-Sanchez J. Structure and evolution of *Acinetobacter baumannii* plasmids // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. Art. 1283.

Touchon M., Cury J., Yoon E., Krizova L., Cerqueira G., Murphy C. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences // *Genome Biology and Evolution*. 2014. Vol. 6. P. 2866–2882.

Mindlin S., Maslova O., Beletsky A., Nurmukanova V., Zong Z., Mardanov A., Petrova M. Ubiquitous Conjugative Mega-Plasmids of *Acinetobacter* Species and Their Role in Horizontal Transfer of Multi-Drug Resistance // *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. Art. 728644.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕЕ, НА СТАНДАРТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Д. А. Авданина¹, Е. А. Сорокина^{1,2}
В. И. Кукушкина^{2,3}, А. А. Жгун¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К. Г. Скрыбина
Москва, e-mail: office@biengi.ac.ru

²Российский университет дружбы народов, Москва, e-mail: helpdesk@rudn.ru

³РХТУ им Д. И. Менделеева, Москва, e-mail: pochta@muctr.ru

В разрушении памятников искусства огромную роль играют микроорганизмы. Большое разнообразие органических и неорганических материалов, содержащихся в произведениях искусства, зачастую являются благоприятной средой для биологической колонизации, что вызывает эстетические и структурные повреждения. При определении целей консервационного воздействия необходим баланс между исторической и реставрационной составляющей. Проводить восстановительные работы над объектом культурного наследия следует с минимальным физическим вмешательством.

Наша работа проводилась в основном историческом здании Государственной Третьяковской галереи в залах Древнерусского искусства (ГТГ, Москва, Лаврушинский переулок, 10). Поскольку здание длительно эксплуатировалось (с сер. XIX в.) для хранения и экспозиции предметов культурного наследия в нем появилась своя специфика. В настоящее время в залах ГТГ соблюдаются все меры надлежащего музейного хранения (температура – 19 °С, влажность – 55 %), тем не менее, в них сформировалось свое характерное микробиологическое сообщество. Ранее в работе [Zhgun et al., 2020], после согласования с главным хранителем музейных предметов ГТГ Т. С. Городковой, максимально аккуратно с соблюдением условий стерильности были отобраны свыше 100 проб с экспонатов и поверхностей залов (номера залов 56, 57 и 61). На основании этого создана коллекция культивируемых микроорганизмов, (GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA606688>). Основными доминирующими плесневыми грибами оказались: штамм *Aspergillus versicolor*, *Ulocladium* sp. – с иконы «Церковь Воинствующая» (1550-е) (рис.), *Cladosporium*

halotolerans – с бюстового фрагмента статуи «Святой Великомученик Георгий Победоносец» (1464, известковый камень, темпера), *Aspergillus creber* – с иконы «Святой Великомученик Димитрий Солунский» (XVI в.), *Aspergillus versicolor* STG-86, *Aspergillus creber*, *Cladosporium parahalotolerans*, *Simplicillium lamellicola* – с поверхностей зала 61, *Microascus paisii* – в зале 57, *Aspergillus protuberus* и *Penicillium chrysogenum* – в зале 56.



Рис. Маркировка отбора проб с объектов культурного наследия в зале № 61 ГТГ

Против выявленных доминантных грибов проведена работа по поиску эффективных антисептиков широкого спектра действия на основе алкилнуклеозидов [Alexandrova et al., 2021], хитозана [Zhgun et al., 2020], фосфорсодержащих аналогов аминокислот и аналогов циклических гидроксамовых кислот.

С целью морфологической характеристики представленных доминантных культур в настоящей работе мы провели культивирование на четырех стандартных питательных средах: 1) Чапка – Докса (CDA; г/л: сахароза – 30, NaNO_3 – 2, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, KCl – 0,5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, агар – 20, pH 7,0–7,4), 2) MEA (мальт экстракт – 30, пептон – 5, агар – 20, pH 5,4); 3) РТА (г/л: настоящий картофель (200 г) – 4, глюкоза – 20, агар – 20, pH 5,6); 4) СУА (г/л: сахароза – 30, дрожжевой экстракт – 5, NaNO_3 – 0,3, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, KCl – 0,5, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005, агар – 20, pH 7,0–7,4). Предварительно грибные клетки выращивали на скошенной агаризованной среде CDA

10–15 сут. при температуре 26 °С, собирали 0,9 % р-ром NaCl, разводили до концентрации $\sim 1,7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Аликвоты инокулировали по 3 мкл ($\sim 5 \cdot 10^3$ КОЕ) на чашки Петки с агаризованными питательными средами. Инкубировали при температуре 26 °С. Развитие колоний происходило в два этапа. На первом этапе наблюдали радиальный рост неокрашенных колоний, связанный с вегетативным развитием гриба, трофофазой, заключающийся в 1) получении энергии и строительного материала для обмена веществ и 2) синтезе макромолекул и липидов для увеличения биомассы [Demain, 1986]. На втором этапе, помимо увеличения диаметра колоний, отмечали появление характерной текстуры и пигментирования поверхности гриба и самой агаризованной среды, а в некоторых случаях, выделение на поверхности колоний эксудата – окрашенных капель жидкости. Для большинства грибов переход организма в идиофазу (синтез характерных вторичных метаболитов) наблюдался на 7–10-й день. Исключение составил *Ulocladium* sp. AAZ-2020a STG-36, проявивший повышенную скорость роста (5–6 сут.) Для характеристики грибных колоний проводили световую микроскопию в нативных условиях на микроскопе Carl Zeiss Jena (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$.

В нашей работе проведена морфологическая характеристика (на стандартных микробиологических средах) мицелиальных грибов – деструкторов художественных материалов темперной живописи. Всесторонняя характеристика этих микроорганизмов необходима при разработке препаратов комплексного действия для защиты объектов культурного наследия в Государственной Третьяковской галерее от биопоражения.

Литература

- Alexandrova L. A., Jasko M. V., Negrya S. D., Solyev P. N., Shevchenko O. V., Solodinin A. P., Kolonitskaya D. P., Karpenko I. L., Efremenkova O. V., Glukhova A. A., Boykova Y. V., Efimenko T. A., Kost N. V., Avdanina D. A., Nuraeva G. K., Volkov I. A., Kochetkov S. N., Zhgun A. A. Discovery of novel N4-alkylcytidines as promising antimicrobial agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. Vol. 215. P. 113212. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113212>
- Demain A. L. Regulation of secondary metabolism in fungi // *Pure and Applied Chemistry*. 1986. Vol. 58, N 2. P. 219–226. <https://doi.org/10.1351/pac198658020219>
- Zhgun A. A., Avdanina D. A., Shagdarova B. T., Troyan E. V., Nuraeva G. K., Potapov M. P., Il'ina A. V., Shitov M. V., Varlamov V. P. Search for Efficient Chitosan-Based Fungicides to Protect the 15th–16th Centuries Tempera Painting in Exhibits from the State Tretyakov Gallery // *Microbiology (Russian Federation)*. 2020. Vol. 89, N 6. P. 750–755. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060193>
- Zhgun A., Avdanina D., Shumikhin K., Simonenko N., Lyubavskaya E., Volkov I., Ivanov V. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // *PLOS ONE*. 2020. Vol 15, N 4. e0230591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230591>

ВАКУОЛЯРНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ЗЕЛеноЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *COELASTRELLA RUBESCENS* НА СВЕТУ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Д. А. Бахарева, А. А. Зайцева, П. А. Зайцев, К. А. Чеканов,
О. А. Горелова, Е. С. Лобакова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, e-mail: bakharevada@gmail.com

Зеленая микроводоросль *Coelastrella rubescens* (Chlorophyceae) обитает в наземно-воздушной среде и в условиях стресса способна накапливать в клетках липиды и вторичные каротиноиды. В ряде исследований данная микроводоросль рассматривается как продуцент смеси вторичных каротиноидов [Minyuk et al., 2016; Minyuk et al., 2017], имеющих большое практическое значение, в частности астаксантин, который является компонентом ряда косметических средств, кормов для рыб и ракообразных в аквакультуре [Liu et al., 2021]. Ранее для штамма *C. rubescens* NAMSU R1 была описана способность накапливать при стрессе смесь каротиноидов: астаксантин, β -каротин, α -каротин, кантаксантин и эхиненон [Zaytseva et al., 2021], что указывает на актуальность исследований данного штамма. Зеленые микроводоросли, помимо каротиноидов, способны накапливать в биомассе широкий круг ценных для биотехнологии метаболитов, например, ПНЖК, полисахариды, белки.

Целью данной работы было исследование локализации, структуры и элементного состава вакуолярных включений микроводоросли *C. rubescens* NAMSUR1.

В данной работе впервые проведен сравнительный морфологический, ультраструктурный и элементный анализ вакуолярных включений клеток *C. rubescens* NAMSU R1 при культивировании на минеральной среде BG-11 в условиях низкой (40 мкмоль фотонов/(м²с) ФАР) и высокой (вызывающей стресс) интенсивности освещения (150 мкмоль фотонов/(м²с) ФАР). Клетки микроводоросли изучали при помощи световой микроскопии с окрашиванием флуоресцентным красителем DAPI, поляризационной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и ПЭМ в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией.

В клетках штамма *C. rubescens* NAMSU R1, культивируемых при обоих вариантах плотности потока ФАР, с помощью световой микроскопии были обнаружены включения, которые при окрашивании DAPI испускали флуоресценцию в желто-зеленой области спектра,

что свидетельствует о накоплении клетками неорганического фосфора в виде полифосфатов. Кроме того, были обнаружены включения, не обладавшие характерной для полифосфатов флуоресценцией, они были визуализированы при помощи поляризационной микроскопии с подтверждением их кристаллической структуры.

Данные электронной микроскопии показали наличие в вегетативных клетках и автоспорах в спорангиях вакуолей с разнообразными по ультраструктуре, упаковке и электронной плотности включениями при культивировании на свету низкой и высокой интенсивности. Также в клетках, выращенных на свету высокой интенсивности были обнаружены вакуоли с аутофагическими телами.

Анализ элементного состава обнаруженных вакуолярных включений показал наличие в них фосфора и/или азота. Крупные вакуолярные глобулы в клетках на свету низкой интенсивности преимущественно содержали фосфор. Включения кристаллического вида, наблюдавшиеся в клетках при обоих условиях культивирования, преимущественно содержали азот.

В данной работе впервые в составе вакуолярных включений микроводоросли *S. tubescens* обнаружены кристаллы с высоким содержанием азота; показано их формирование в условиях поздней стационарной фазы роста культуры при разной интенсивности света. В данном исследовании показана полифункциональность вакуолей в связи с накоплением в них разных по структуре, функциям и элементному составу включений. Вероятно, вакуоли у данного штамма микроводорослей участвуют в акклимации к неблагоприятным условиям внешней среды, т. е. играют роль «адаптивных органелл». Такие органеллы обеспечивают внутриклеточный гомеостаз за счет формирования и расходования внутриклеточных резервов биогенных элементов, а также реализуют экстренные перестройки в клетке по механизму стресс-индуцированной аутофагии.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-1952.2021.1.4).

Литература

- Liu C., Hu B., Cheng Y., Guo Y., Yao W., Qian H. Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments // *Bioresour. Technol.* 2021. Vol. Art. 125398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125398>
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chivkunova O., Chekanov K., Lobakova E., Sidorov R., Solovchenko A. pH and CO₂ effects on *Coccoloba (Scotiellopsis) rubescens* growth and metabolism // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. Vol. 63. P. 566–574. <https://doi.org/10.1134/S1021443716040105>

Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids // *Algae*. 2017. Vol. 32. P. 245–259. <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6>

Zaytseva A., Chekanov K., Zaytsev P., Bakhareva D., Gorelova O., Kochkin D., Lobakova E. Sunscreen effect exerted by secondary carotenoids and mycosporine-like amino acids in the aeroterrestrial Chlorophyte *Coelastrella rubescens* under high light and UV-A irradiation // *Plants*. 2021. Vol. 10. Art. 2601. <https://doi.org/10.3390/plants10122601>

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В ОТВЕТ НА ИНАКТИВАЦИЮ ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ГЕНОВ В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ И АКТИВНОГО ДЕЛЕНИЯ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

В. А. Бидюк, А. И. Александров

Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва
e-mail: victoria.bidiuk@gmail.com

Грибы имеют огромное влияние на многие сферы жизни человека. Одноклеточные дрожжеподобные грибки не являются исключением. Среди дрожжевых грибков есть как широко распространенные патогены человека, вызывающие серьезные заболевания, так и промышленно и научно ценные виды, в том числе и *Saccharomyces cerevisiae*, или так называемые пекарские дрожжи. Использование этих дрожжей в качестве модельного организма дает возможность не только изучать фундаментальные механизмы клеточной гибели на молекулярном уровне, но и использовать эти знания для решения важных проблем, таких как поиск новых лекарств для лечения грибковых инфекций [Auerbach et al., 2005]. Грибковые инфекции, в том числе вызванные и дрожжеподобными грибами, такими как представители рода *Candida*, способны вызвать инвазивные инфекции у людей с пониженным иммунитетом, при системном использовании антибактериальных препаратов и во многих других случаях. Особо важной эта проблема стала в последнее время в связи с глобальным распространением COVID-19 [Rodrigues, Nosanchuk, 2020].

Одним из путей поиска новых способов лечения грибковых инфекций может быть изучение отдельных генов, отключение которых вызывает быструю гибель дрожжевой клетки. Такие гены и их продукты могут быть мишенью для новых лекарств против грибковых инфекций.

В данном исследовании использовалась коллекция термочувствительных мутантов, созданных на основе штамма *S. cerevisiae* BY4741. Белковый продукт гена, имеющего термочувствительную мутацию, теряет свою активность при помещении клеток в непермиссивную температуру 37 °С. Получали логарифмическую культуру изучаемых штаммов, после этого клетки помещали в YPD или дистиллированную воду в термостат с температурой 24 и 37 °С. Для исследования жизнеспособности клетки высевали для подсчета колониеобразующих единиц. Для измерения степени поляризации клеточной мембраны использовали флуоресцентный краситель DiBAC4 (3). Пермеабилзация клеточной мембраны исследовалась окрашиванием клеток йодидом пропидия. Подсчет окрашенных клеток выполнялся с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX™ (Beckman).

В данной работе был проведен скрининг коллекции, состоящей из более чем 700 мутантов с термочувствительной аллелью. Клетки проверяли на жизнеспособность в условиях повышенной температуры при условии наличия (YPD) или отсутствия (вода) питательных веществ. Предполагалось, что отсутствие питательных веществ приостанавливает все основные процессы, в том числе клеточное деление. Таким образом, в описанных условиях клетка пребывает в состоянии покоя. В результате скрининга были выделены 70 мутантов, жизнеспособность которых снижалась после инкубации в воде на 37 °С на протяжении 48 ч. В результате скрининга было выделено 10 мутантов, жизнеспособность которых заметно снижалась после инкубации в воде на 37 °С на протяжении 24 чв. Эти штаммы были проверены на уровень АФК; оказалось, что для почти всех штаммов количество АФК не превышает или превышает незначительно контрольные значения. Инкубация на непермиссивной температуре в присутствии антиоксидантов также не снизила уровень гибели среди мутантов, что подтверждает независимость клеточной гибели от окислительного стресса. Кроме того, был проанализирован потенциал клеточной мембраны; для ряда штаммов уровень потенциала был существенно завышен, в то время как для других штаммов потенциал клеточной мембраны сильно упал. Также было обнаружено, что количество клеток, способных к образованию колоний было существенно меньше, чем неокрашенных пропидием клеток (т. е. живых, не некротических), что указывает на гибель этих штаммов не-некротическим путем. Роль пермеабилзации мембраны в клеточной гибели была также проверена путем осмостабилизации клеток. Осмостабилизация была осуществлена путем добавления в инкубационные

растворы сорбитола в количестве 0,8 М. Оказалось, что осмостабилизация никаким образом не влияет на клеточную гибель.

Ранее нами было показано, что повышение рН в среде повышает степень выживаемости мутантных клеток с повышенной вероятностью клеточной гибели [Alexandrov et al., 2021]. Для описанных выше мутантов было установлено, что повышение уровня рН до 7,0 с использованием буферной системы никаким образом не влияет на процент умерших клеток.

Таким образом, отключение определенных генов может приводить к гибели даже в условиях, когда клетка не способна делиться и не подвергается никаким дополнительным стрессам. Гибель штаммов с отключенными генами сопровождается нарушением потенциала клеточной мембраны, однако гибель в данных условиях не является следствием пермеабиллизации мембраны и не может быть предотвращена осмостабилизацией, что указывает на то, что клетки гибнут апоптозом.

Литература

Auerbach D., Arnoldo A., Bogdan B., Fetchko M., Stagljar I. Drug Discovery Using Yeast as a Model System: A Functional Genomic and Proteomic View // Current Proteomics. 2005. Vol. (2)1.

Rodrigues M. L., Nosanchuk J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials // PLOS Neglected Tropical Diseases. 2020. Vol. 14(2). e0007964

Alexandrov A. I. et al. Systematic identification of yeast mutants with increased rates of cell death reveals rapid stochastic necrosis associated with cell division // bioRxiv. 2021. 10.20.465133

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД БЕРИНГОВА И ОХОТСКОГО МОРЕЙ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

М. П. Бынина, Е. В. Матосова

Научно исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток
e-mail: marina.bynina@mail.ru

В настоящее время общепризнано, что основной формой существования микроорганизмов являются биопленки, представляющие собой конгломерат бактерий, прикрепленных к поверхности и друг к другу посредством внеклеточного полимерного матрикса, состоящего из белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот и других веществ [Терентьева, 2014]. Бактерии, находясь в прикрепленном состо-

янии, в составе биопленок в определенной мере защищены от факторов внешней среды, а формирование биопленочных сообществ оказалось одной из основных форм адаптаций бактерий к окружающей среде [Гостев, 2010]. Известно, что бактерии рода *Yersinia* относятся к возбудителям сапрозоонозов и способны существовать как в организме человека и животных, вызывая инфекционный процесс, так и в объектах окружающей среды [Сомов, 2004]. Иерсинии, как и большинство патогенных микроорганизмов, способны образовывать биопленки в неблагоприятных для них условиях, а их выживаемость в морской воде зависит от физико-химических факторов морских экосистем, которые влияют на жизнеспособность микроорганизмов, а также на адаптацию и сохранения ими патогенности [Бухарин, 2005]. В настоящее время повышенное внимание уделяется воздействию антропогенного фактора на морские экосистемы. Основными источниками загрязнения являются попадание в водную среду производственных отходов, нефтепродуктов, пестицидов и других поллютантов. Полициклические ароматические углеводороды считаются сильными химическими канцерогенами; фенолы – одни из наиболее распространенных загрязнителей, поступающих в поверхностные воды со стоками предприятий, опасны для рыб и других водных организмов, включая млекопитающих; хлорорганические пестициды имеют высокую токсичность и способны накапливаться во внешней среде.

Цель работы: оценить способность *Y. pseudotuberculosis* к формированию биопленки в поверхностных водах Берингова и Охотского морей *in vitro*.

В работе использован штамм *Y. pseudotuberculosis* (штамм 512, I серотип) коллекции микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова. Пробы морской воды взяты из Берингова и Охотского морей. Забор воды проведен на глубине 3–4 м, исключая прибрежную зону. Химический состав воды исследован в эколого-аналитическом центре Дальневосточного федерального университета. Для контроля готовили искусственную морскую воду. В качестве подложки для выращивания биопленки использовали предметные стекла со специальным покрытием Superfrost Plus и Polysine. Предметные стекла помещали вертикально в закрытую систему, в которой циркулировалась взвесь готовой бактериальной культуры *Y. pseudotuberculosis* в морской воде в концентрации 10^9 мк/мл, при температуре 6–8 °С. Динамическая модель с перистальтическим насосом создавала движение жидкости 50 мл/мин, тем самым обеспечивая естественные условия для выращивания биопленки. После ин-

кубации в течение 72 ч стекла трехкратно промывали дистиллированной водой для освобождения от планктонных форм бактерий. После этого препараты окрашивали в течение 15 мин. Предварительно двухкомпонентный краситель кристаллический фиолетовый смешивали с сафранином в соотношении 1:1. Наносили готовый раствор на стекла и равномерно распределяли по всей поверхности. Далее предметные стекла промывали дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре и измеряли значения оптической плотности в разных точках поверхности с помощью спектрофотометра [Ляпун, 2018].

При исследовании состава проб морской воды, взятой из Берингова и Охотского морей, были определены показатели содержания в них загрязняющих химических веществ (поллютантов) а именно: полициклических ароматических углеводородов, алкифенолов, хлорорганических пестицидов и нефтеуглеводородов. Полученные данные уровней фоновых концентраций компонентов ПАУ в поверхностных водах ниже установленных санитарно-гигиенических нормативов предельно допустимых концентраций. В пробе, взятой из Охотского моря, концентрация определяемых в воде хлорорганических пестицидов и алкифенолов не превышает предельно допустимые концентрации. Концентрация нефтяных углеводородов находится в пределах нормы во всех пробах морской воды. Концентрация дифенила и хлорорганического пестицида в пробе, взятой из Берингова моря выше предельно допустимых концентраций. По сведению некоторых авторов алкифенолы обладают бактерицидным и дезинфицирующим эффектами и могут повлиять на рост биопленки.

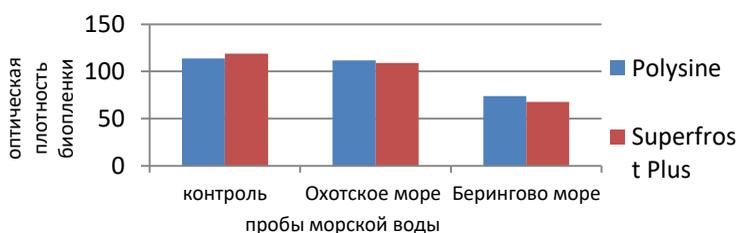


Рис. Формирование биопленки *Y. pseudotuberculosis* 512 на стеклах с покрытием Polysine и Superfrost Plus

В результате проведенных нами исследований выявлена динамика роста биопленки *Y. pseudotuberculosis* на всех предметных стеклах с адгезивными покрытиями Superfrost Plus и Polysine (рис.). При анализе результатов влияния химических веществ на формирование

био пленок в пробе воды взятой из Берингова моря выявлено ингибирование био пленки на 39 % по сравнению с контролем, в пробе из Охотского моря менее 1 %. Установлено, что рост био пленки показал сходный результат на двух видах предметных стекол с адгезивными покрытиями. Статистическая значимость различий между двумя видами предметных стекол в данном исследовании оказалась не достоверной. Исходя из наших полученных результатов снижение численности микроорганизмов, может быть обусловлено наличием в составе загрязняющих химических веществ.

Заключение. Установлено, что бактерия рода *Y. pseudotuberculosis* способна формировать био пленку в пробах морской воды, взятых из Берингова и Охотского морей. Установлено, что химические вещества, являющиеся источником загрязнения водных сред, способны оказывать негативное влияние на био пленкообразование. Сравнительная характеристика динамики роста *Y. pseudotuberculosis* опытных и контрольных проб свидетельствует о сохранении жизнеспособности и патогенного потенциала бактерий в стрессорных условиях морских экосистем.

Литература

- Бухарин О. В., Гинцбург А. Л., Романова Ю. М., Эль-Регистан Г. И. Механизмы выживания бактерий // Медицина. 2005. С. 366.
- Гостев В. В., Сидоренко С. В. Бактериальные био пленки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010. № 3 (2). С. 4–15.
- Ляпун И. Н., Бынина М. П., Кусайкин М. И., Андрюков Б. Г., Матосова Е. В., Макаренкова И. Д., Ермакова С. П., Звягинцева Т. Н. Формирование био пленки *Yersinia pseudotuberculosis* в токе жидкости на абиотических поверхностях, обработанных фукоиданами бурых водорослей Японского моря // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2018. № 75. С. 19–26.
- Сомов Г. П. Современные представления о сапронозах и сапрозоонозах // Ветеринарная патология. 2004. № 3. С. 31–35.
- Терентьева Н. А., Тимченко Н. Ф., Рассказов В. А. Исследование влияния биологически активных веществ на формирование бактериальных био пленок // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. № 3(57). С. 54–55.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОСТОСТИМУЛЯЦИИ ШТАММА *BACILLUS THURINGIENSIS* SSP. *KURSTAKI* 7-14 КС АТРАНОВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

О. Ф. Вятчина¹, С. Н. Адамович², Ю. П. Джигоев³
Н. А. Рубаненко¹, Е. Н. Оборина², А. С. Григорьева¹
Н. А. Арефьева¹, Я. А. Портная³, В. И. Злобин³

¹Иркутский государственный университет, Иркутск, e-mail: olgairk3@rambler.ru

²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск

³Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск
e-mail: alanir07@mail.ru

Введение. Бактерия *B. thuringiensis* известна своей способностью продуцировать кристаллические (Сгу) и цитолитические (Сут) токсины (δ -эндотоксины), обладающие специфичностью по отношению к насекомым и некоторым другим беспозвоночным [Palma et al., 2014].

Биопрепараты на основе *B. thuringiensis* занимают приоритетное место на рынке средств защиты растений, являясь наиболее эффективными и безопасными для окружающей среды [Pane et al., 2012]. При производстве биоинсектицидных препаратов важным аспектом является увеличение продуктивности бактерии-продуцента, что приводит к снижению производственных затрат. Одними из эффективных химических соединений для стимуляции роста бактерий могут стать атрановые соединения, обладающие биологической активностью [Воронков, Барышок, 2010]. Атрановые соединения – это новое поколение биологически активных веществ, которые способны оказывать ростостимулирующее действие на микроорганизмы. В ряде работ их стимулирующее влияние было показано на бактериях: *S. aureus*, *E. coli* [Adamovich, 2019].

Цель данной работы: оценить влияние трех модификаций атрановых соединений на рост *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* 7-14 кс.

Материалы и методы. Объектом исследования служил штамм *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 7-14 кс (коллекция штаммов микроорганизмов кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВО «ИГУ») [Вятчина, 2004]. В качестве стимуляторов роста (СР) использовали три атрановых соединения с общей формулой: $ArXCH_2COO^- \cdot NH(CH_2CH_2OH)_3$ (где X = O, S, SO₂): трис(2-гидроксиэтил)аммоний 2-метилфенил-оксиацетат (СР 1); трис(2-гидроксиэтил)аммоний 4-хлорфенил-сульфанилацетат (СР 2); трис(2-гидроксиэтил)аммоний 4-хлорфенил-сульфониацетат (СР 3).

Для культивирования применяли жидкую среду LB (пептон – 1,0 %; дрожжевой экстракт – 0,5 %; NaCl – 1,0 %) с добавлением исследуемых атрановых соединений (АТ) в концентрации от 10^{-4} до 10^{-8} %. Контролем служила среда LB без добавления АТ. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 30 °С в стационарных условиях. Количество клеток в средах определяли при помощи метода серийных разведений с последующим высевом на плотную среду LB.

Результаты. Выраженный стимулирующий эффект по отношению к *B. thuringiensis* обнаружен у атранового соединения **3 (СР 3)** в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-8} %. Наиболее высокие показатели роста отмечали в среде, содержащей 10^{-4} % **СР 3**. При этом количество клеток было на порядок выше по сравнению с контролем – $(1,60 \pm 0,15) \cdot 10^8$ и $(1,5 \pm 0,15) \cdot 10^7$ КОЕ/мл, соответственно. В средах с 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} % **СР 3** численность клеток была больше, чем в контроле в 7,8; 7,3; 6,3 и 4,7 раза, соответственно (рис. 1).

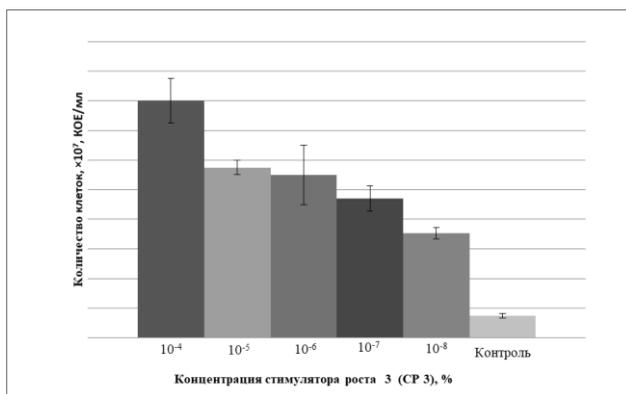


Рис. 1. Влияние атранового соединения 3 (концентрации 10^{-4} – 10^{-8} %) на рост штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki* 7-14 кс в среде LB

Атрановые соединения **2 (СР 2)** и **1 (СР 1)** оказывали выраженное ростостимулирующее действие при концентрации 10^{-4} %. В этом случае численность клеток превышала таковую в контроле в 4 и 2 раза, соответственно (рис. 2).

Таким образом, атрановое соединение **3** является наиболее оптимальным стимулятором для роста изучаемого штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki*.

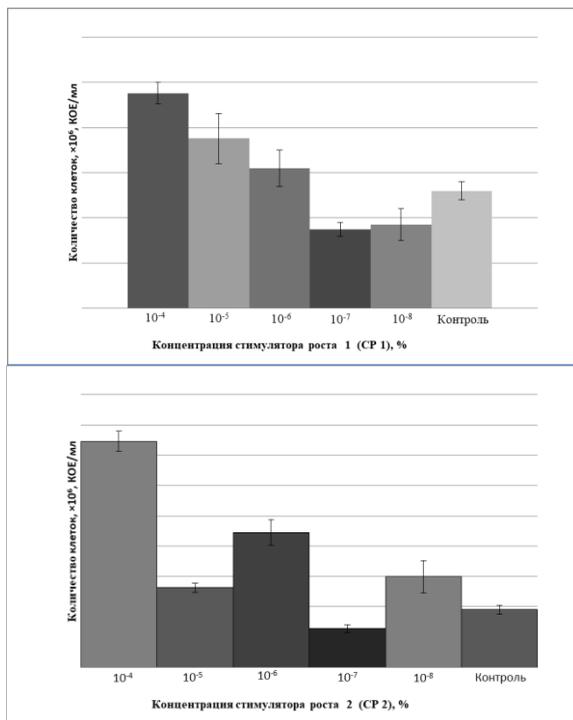


Рис. 2. Влияние атрановых соединений 1 и 2 (концентрации 10^{-4} – 10^{-8} %) на рост штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki* 7-14 кс в среде LB

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-43-380001.

Литература

- Воронков М. Г., Барышков В. П. Атраны – новое поколение биологически активных веществ // Вестник РАН. 2010. Т. 80, № 11. С. 985–992.
- Вятчина О. Ф. Штаммы *Bacillus thuringiensis*, выделенные при эпизоотии лиственничной мухи (*Hylemyia laricicola*) в Камчатской области // Сибирский экологический журнал. 2004. № 4. С. 501–506.
- Adamovich S. N. New atranes and similar ionic complexes. Synthesis, structure, properties // Appl. Organomet. Chem. 2019. Vol. 33. e4940.
- Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity // Toxins. 2014. Vol. 6, Is. 12. P. 3296–3325.
- Pane C., Vilelco D., Campanile F., Zaccardelli M. Novel strains of *Bacillus* isolated from compost and compost-amended soils as biological control agents against soil-borne phytopathogenic fungi // Biocontrol Science and Technology. 2012. Vol. 22, Is. 12. P. 1373–1388.

РОЛЬ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ И ОСМОЛИТОВ В АДАПТАЦИИ ПСИХРОТОЛЕРАНТНОГО МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *MUCOR SP.*

О. А. Данилова¹, Е. А. Януцевич¹, Г. А. Кочкина², В. М. Терёшина¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии
им. С. Н. Виноградского РАН, Москва, e-mail: olga.a.danilova@bk.ru
²ФГБУ науки Институт физиологии и биохимии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина, Пушкино, e-mail: g.kochkina@kstu.kz

Микроскопические грибы не имеют себе равных по способности осваивать разнообразные экологические ниши и адаптироваться к различным условиям окружающей среды. Одним из самых распространенных стрессорных факторов является действие низких температур, которые представляют опасность для клеток в первую очередь в связи с нарушением работы мембраны в результате ее перехода от жидкокристаллического к гелевому состоянию. Ответ клетки на снижение температуры среды включает изменение состава мембранных липидов, синтез осмолитов (полиолов и трегалозы) и белков холодового и теплового шока [Robinson, 2001; Inouye, Phadtare, 2014; Yusuf et al., 2021]. Текучесть мембраны зависит от степени ненасыщенности жирных кислот мембранных фосфолипидов, а также от соотношения стерины/фосфолипиды, снижение которого способствует увеличению текучести мембран.

Мицелиальный гриб *Mucor sp.* (ВКМ F-4102D), выделенный из грунта пещеры «Ледяная» (Красноярский край), обладает способностью развиваться с высокой скоростью при низких температурах и может быть использован в качестве модельного объекта для изучения механизмов адаптации грибов к низким температурам.

Целью данного исследования является изучение роли мембранных липидов и осмолитов в адаптации психротолерантного мицелиального гриба *Mucor sp.*

При оптимальной температуре 20 °С скорость линейного роста гриба в поверхностной культуре достигает 15 мм/сут. При самой низкой изученной температуре 4 °С скорость роста гриба в поверхностной культуре снижается до 6 мм/сут. В глубинной культуре при 20 °С уже на 2-е сут. гриб накапливает биомассу в количестве до 7 г/л, при 4 °С данное значение достигается за 7–10 сут. Таким образом, при понижении температуры скорость роста гриба снижается, однако остается очень высокой по сравнению с другими видами психротолерантных грибов.

Состав мембранных липидов и осмолитов был изучен в динамике роста глубинной культуры гриба при температурах 20 и 4 °С в течение 4 и 15 сут. соответственно. В составе мембранных липидов гриба обнаружены фосфатидные кислоты (ФК), фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ), стерины (Ст), кардиолипины, фосфатидилсерины, сфинголипиды, фосфатидилинозиты и лизофосфатидилэтаноламины. Доминирующими мембранными липидами при 20 °С являются ФК, ФЭ, ФХ и Ст, при этом в динамике роста доля ФК снижается с 57 до 41 % от суммы, доли ФЭ, ФХ и Ст немного возрастают: ФЭ – с 17 до 26 %, Ст – с 7 до 16 %, ФХ – с 6 до 11 %. Доминирующими мембранными липидами при 4 °С являются ФК, ФЭ и ФХ, при этом в динамике роста их доли изменяются слабо: доля ФК снижается с 60 до 54 %, доли ФЭ и ФХ возрастают с 22 до 29 % и с 3 до 8 % соответственно. Доля стерина не превышает 5 %. Таким образом, соотношение стерина/фосфолипиды при до 4 °С значительно ниже, чем в варианте 20 °С. Степень ненасыщенности фосфолипидов при культивировании в условиях 4 °С достигает значения 1,8 и не снижается в динамике роста, тогда как в варианте 20 °С она значительно снижается с возрастом культуры.

При обеих изученных температурах общее количество углеводов у *Micor sp.* невелико и составляет до 3 % от сухой биомассы. Качественный состав углеводов не различается, основными являются трегалоза, глюкоза, глицерин и маннит. При 20 °С в молодой культуре гриба (1 сут) доминирующими углеводами являются глюкоза (57 %) и трегалоза (38 %). Далее в течение 1 сут. доля трегалозы повышается до 70 % на фоне снижения доли глюкозы до 27 %. Данное соотношение углеводов поддерживается далее в динамике роста. При 4 °С в молодой культуре гриба доминирующими углеводами являются глюкоза (53%), трегалоза (24 %) и глицерин (21 %). В динамике роста культуры относительное содержание глюкозы и трегалозы меняется так же как и при 20 °С, а доля глицерина постепенно снижается с 21 % до 3 %.

Таким образом, снижение соотношения стерина/фосфолипиды и высокая степень ненасыщенности фосфолипидов способствуют повышению текучести мембран, что, наряду с поддержанием высокого относительного содержания трегалозы, может являться основным механизмом адаптации психротолерантного мицелиального гриба *Micor sp.* к низким температурам.

Литература

- Inouye M., Phadtare S. Cold-shock response and adaptation to near-freezing temperature in cold-adapted yeasts // Cold-adapted Yeasts. 2014. <https://doi.org/10.1126/stke.2372004pe26>
- Robinson C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi // New Phytol. 2001. Vol. 151. N.2. P. 341–353. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00177.x>
- Yusof N. A., Hashim N. H. F., Bharudin I. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the antarctic yeast, *glaciozyma antarctica* pi12 // J. Fungi. 2021. Vol. 7, N 7. <https://doi.org/10.3390/jof7070528>

О РОЛИ АДАПТАЦИЙ К УСЛОВИЯМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ В РАСПРОСТРАНЕНИИ И ЭВОЛЮЦИИ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *VOLVOX*

А. Г. Десницкий

Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербург, e-mail: adesnitskiy@mail.ru

Род *Volvox* (Chlorophyceae, Volvocaceae) включает около 25 видов колониальных жгутиковых микроводорослей, которые являются типичными представителями пресноводного планктона. Бесполое колониальное вольвокса состоит из нескольких сотен или тысяч мелких соматических клеток и небольшого числа гонидий (крупных бесполой репродуктивных клеток, которые путем серии делений дают начало дочерним колониям).

В условиях лабораторных культур у *Volvox carteri* f. *nagariensis*, а также у более примитивных колониальных вольвоксовых (например, *Eudorina elegans*, *Pandorina morum* или *Pleodorina californica*) длительный период светозависимого роста гонидий сопровождается их быстрыми делениями без клеточного роста, для протекания которых свет не требуется. Филогенетический анализ [Herron et al., 2010] показал, что такой тип цикла развития является для семейства колониальных вольвоксовых анцестральным, тогда как паттерн развития со светозависимыми и медленными делениями гонидий (у *V. aureus* или *V. globator*) возник в пределах рода *Volvox* конвергентно в разных эволюционных линиях. У двух последних видов вольвокса период делений гонидий весьма продолжительный. Деления начинаются в утренние часы первого дня, прекращаются ночью, снова начинаются утром второго дня, опять блокируются ночью и т. д. Было показано [Desnitskiy, 2016], что *V. aureus* может успешно пройти весь цикл бесполого развития при свето-темновом режиме культивирования 8 ч : 16 ч (вместо обычного для культивирования всех видов вольвокса

свето-темнового режима 16 ч : 8 ч). Развитие культур *V. aureus* продолжается при коротком фотопериоде, однако существенно замедленными темпами: продолжительность бесполого цикла возрастает от примерно 4 до 8 сут. Напротив, у *V. carteri* f. *nagariensis* при таком свето-темновом режиме серия делений гонидий не происходит, развитие полностью блокируется и культуры вольвокса гибнут через нескольких суток (так же, как если бы все время были в темноте).

В пределах рода *Volvox* есть несколько видов с очень широким географическим распространением, каждый на нескольких континентах (например, *V. africanus*, *V. aureus*, *V. globator*, *V. tertius*). Однако ряд видов (например, *V. carteri* f. *nagariensis*, *V. gigas*, *V. pocockiae*, *V. powersii*, *V. spermato-sphaera*) характеризуются ограниченным распространением. Мы попытались выявить корреляцию широтного распространения представителей рода *Volvox* с особенностями свето-темновой регуляции делений клеток по ходу циклов развития [Desnitskiy, 2020]. В относительно высоких широтах Азии, Европы и Северной Америки (к северу от 50–57° с. ш.) встречаются лишь три вида – *V. aureus*, *V. globator* и *V. tertius*. Медленные деления гонидий у них начинаются утром, а ночью временно блокированы. Возможно, что в условиях длинных летних дней такие особенности развития вольвокса имеют адаптивное значение и они оказались важны для формирования современной флоры пресноводных водорослей высоких широт Северного полушария.

Колониальные микроводоросли семейства Volvocaceae, достоверные палеонтологические данные по которым в литературе отсутствуют, произошли, согласно молекулярно-генетическим данным [Herron et al., 2009], примерно 200 миллионов лет тому назад. Таким образом, эволюция рода *Volvox* и родственных ему колониальных вольвоксовых протекала преимущественно в теплом климате юрского и мелового периодов, а также значительной части кайнозоя. Даже зимой или осенью (в условиях коротких световых дней) на относительно высоких палеоширотах Северного полушария температура могла бы быть благоприятной для роста и развития популяций вольвокса. Например, для северных палеоширот 55–65° имеются данные о том, что средняя температура наиболее холодного месяца года часто была около +10 °C [Eldrett et al., 2009]. Есть определенные основания предполагать, что эволюционные перестройки онтогенеза вольвокса (связанные с изменениями скорости, суточных ритмов и свето-темновой регуляции делений гонидий), могли происходить как адаптации к коротким зимним или осенним дням в относительно высоких шירו-

тах в условиях теплого климата в раннем кайнозое. Такое предположение дает ответ на вопрос, почему в ходе эволюции рода *Volvox* серия быстрых делений репродуктивных клеток, которые могли успешно протекать в темноте, замедлялась и становилась светозависимой. Затем вольвоксы с перестроенным циклом развития вселились в более низкие широты и стали сосуществовать там с другими видами семейства Volvocaceae.

Наконец, мы изучили особенности гибели потенциально бесмертных гонидий при ограничении ресурсов в старых культурах двух видов вольвокса. В стареющих культурах *V. carteri* f. *nagariensis* (через 15–20 сут. после пересева на свежую питательную среду) все гонидии перестают вступать в период делений, впоследствии постепенно обесцвечиваются и умирают, разделяя судьбу смертных соматических клеток. Напротив, в старых культурах *V. aureus* на фоне гибели значительной части популяции мы наблюдали в течение продолжительного времени (более 5–6 недель) формирование небольшого числа миниатюрных колоний, содержащих только 1–3 гонидия (против 6–12 гонидий в молодых культурах). При этом не происходило полного прекращения бесполого размножения. Полученный на *V. aureus* результат, возможно, укладывается в рамки пока еще слабо разработанной концепции «альтруистической» гибели клеток [Nedelcu et al., 2011; Durand et al., 2016], согласно которой у ряда одноклеточных протистов в стрессовых ситуациях часть популяции может гибнуть, поддерживая выживание остальных особей. Таким образом, теперь видно, что разные представители одного и того же рода *Volvox* могут характеризоваться не только разными репродуктивными стратегиями в активно растущих культурах, но также и разными стратегиями выживания при ограничении питательных ресурсов.

Попытка объяснить, как могли происходить адаптивные перестройки онтогенеза вольвокса в условиях теплого климата в глубоком прошлом, представляется полезной в свете современной проблемы глобального потепления. Так, в высоких широтах Северного полушария в результате изменения климата могут возникать определенные эволюционные перспективы для ряда видов пресноводных планктонных микроводорослей.

Литература

Desnitskiy A. G. Major ontogenetic transitions during *Volvox* (Chlorophyta) evolution: when and where might they have occurred? // Development, genes and evolution. 2016. Vol. 226. P. 349–354.

Desnitskiy A. G. Problems of species and the features of geographical distribution in colonial volvocine algae (Chlorophyta) // Novosti sistematiki nizshikh rastenii. 2020. Vol. 54. P. 299–311.

Durand P. M., Sym S., Michod R. E. Programmed cell death and complexity in microbial systems // *Current biology*. 2016. Vol. 26. P. R587–R593.

Eldrett J. S., Greenwood D. R., Harding I. C. et al. Increased seasonality through the Eocene to Oligocene transition in northern high latitudes // *Nature*. 2009. Vol. 459. P. 969–973.

Herron M. D., Desnitskiy A. G., Michod R. E. Evolution of developmental programs in *Volvox* (Chlorophyta) // *Journal of phycology*. 2010. Vol. 46. P. 316–324.

Herron M. D., Hackett J. D., Aylward F. O. et al. 2009. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae // *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 2009. Vol. 106. P. 3254–3258.

Nedelcu A. M., Driscoll W. W., Durand P. M. et al. On the paradigm of altruistic suicide in the unicellular world // *Evolution*. 2011. Vol. 65. P. 3–20.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА ДОЛИНЫ СОН-КУЛЬ КЫРГЫЗСТАНА И ИХ АДАПТАЦИЯ К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫМ, ВЫСОКОГОРНЫМ УСЛОВИЯМ

Т. Д. Доолоткельдиева¹, Б. Ш. Бектурганова², С. Т. Бобушева¹

¹Кыргызско-Турецкий университет Манас, Бишкек, Киргизия
e-mail: tdoolotkeldieva@gmail

²Кыргызский аграрный университет им. К. И. Скрябина, Бишкек
e-mail: baku_knau@mail.ru

Температура многих районов на Земле опускается зимой ниже точки замерзания, а летом поднимается до 30 °С и выше. Однако есть много областей с умеренным климатом, где температура почвы никогда не достигает 20 °С [Gray, Williams, 1971; Hoj et al., 2008]. К таким местообитаниям относятся и почвы исследуемой нами высокогорной долины Сон Куль. Здесь температура почвы способны опускаться в течение года значительно ниже точки замерзания.

В условиях резкого перепада сезонных температур микроорганизмы, обладающие способностью расти в широком интервале температур, от отрицательных до 30 °С, ответственны за разложение органического вещества. Более того, в экосистемах, находящихся под воздействием постоянно низких температур, наряду с истинными психрофилами обнаружены психротрофы, успешно развивающиеся в условиях, далеких от оптимальных [Wilson, Brimble, 2009; Pulschen et al., 2017].

Высокогорная долина Сон-Куль представляет собой уникальный и еще неисследованный уголок Земного шара с точки зрения изученности микробиологического биоразнообразия, которое определяет процессы распада и трансформации растительного органического вещества при низких температурных режимах. Данная территория

сильно приподнята, включает окруженную со всех сторон горами высокогорную котловину озера Сон-Куль и находится на высоте 3016–3960 м над у. м. Климат бассейна характеризуется преобладанием сильных холодных ветров, короткого и холодного лета со средней температурой июля +11 °С, продолжительной и холодной зимы. Среднегодовая температура воздуха –3,5 °С. Температура января –20 °С, годовое количество осадков 350–400 мм, погода резко меняется в течение дня. Почвы здесь субальпийские и альпийские, лугового-степные и луговые.

Целью настоящей работы явилось изучение численности и таксономической структуры сапротрофного блока бактерий в биотопах, расположенных на разных высотных поясах Сон-Кульской долины для оценки роли почвенных микроорганизмов в трансформации органических растительных остатков в низких температурных жизненных условиях.

Пробы отбирали из ризосферной почвы и почвы без растительности в летний период (июль месяц) из 10 биотопов через каждые 100 м по мере увеличения высоты от берега озера к вершинам субальпийского и альпийского поясов хребта Кондой-Тоу с вечной мерзлотой в летний период. С помощью классического метода микробиологии и анализа последовательностей 16S rRNA впервые было изучено биоразнообразие микробных комплексов низкотемпературных почв долины Сон-Куль. ДНК экстрагировали из 5,0–7,0 г почвенного материала с использованием набора для выделения ДНК PowerSoil (Mobic Laboratories, Solana Beach, CA, USA).

В данной работе представлено количество колониеобразующих единиц (КОЕ) аммонифицирующих бактерий, способных расти при температуре 15–20 °С. Мы учитывали только те виды бактерий, которые были способны расти при 15–20 °С, рассматривая этот диапазон температурным оптимумом, при котором гетеротрофные, аммонифицирующие бактерии могут активно участвовать в разложении растительных остатков в короткий летний период этого уголка земного шара. Численность бактерий, осуществляющих разложение органических остатков, в разных биотопах колебалась от $2,3 \cdot 10^3$ до $23,3 \cdot 10^3$ клеток г/почвы, что свидетельствует в целом о низкой бактериальной биомассе в этом высокогорном районе. Наиболее богаты по содержанию аммонифицирующих бактерий были темно-каштановые почвы участка «Узун-Булак», где КОЕ бактерий составляли $23,3 \cdot 10^3$ клеток г/почвы. Наиболее минимальные значения были обнаружены в почве, взятой из-под ледника (на высоте 3244 м над уровнем моря), где КОЕ составляла $3 \cdot 10^2$ клеток г/почвы.

Структура видового состава бактерий отличалась в почвах под различным покровом растительности по мере возрастания высоты местности. Анализ последовательностей 16S rRNA показал, что в летний период в почвах высокогорной долины Сон-Куль доминирующими филогенетическими группами были филотипы: *Actinobacteria* (55,0 %), *Gamma*proteobacteria (33,0 %) и *Firmicutes* (22,0 %). В зависимости от растительного покрова и высотного пояса было обнаружено резко отличающееся биоразнообразие бактериального сообщества, составляющее ризосферную микрофлору. Так, на берегу озера Сон-Коль (10 м от пляжа), расположенного на высоте 3027 м. а. с. л., был покрыт растительностью – низкотравными лугами, где преобладал шлемник обыкновенный (*Scutellaria galericulata*). Тип почвы – торфяная альпийская дерновина с pH 7,7 и температурой 8,3 °C. На этом участке в ризосфере шлемника доминировали спорообразующие бактерии – представители филотипа *Firmicutes*: *Bacillus sp.*, *Bacillus pumilus*, *Bac. safensis*, *Bac. altitudinus*. Также неспорообразующие представители той же филогенетической группы: *Lactobacillus rhamnosus*, *Coprococcus eutactus*, *Dorea longicatena*, *Heliobacterium Modesticaldum Ice1*. На местности в 100 м от берега Сон-Куля расположенной на высоте 3031 н. у. м., покрытой растительностью преобладанием эдельвейсов (*Leontopodium fedschen-kaanum*), в ризосфере альпийских цветков были обнаружены только неспорообразующие бактерии филотипа *Gamma*proteobacteria: *Pseudomonas putida*, *Ps. luorescens*, *Ps. migulae*, *Ps. tolaasii*, *Ps. corrugata*, *Ps. thivervalensis*, *Ps. chlororaphis subsp.aurantiaca*, *Ps. brassicacearum*, *Ps. sp.* Здесь тип почвы – горно-буро-темный с pH 7,17 и температурой 10,0 °C. Тогда как на участке расположенного на вершине горы Кондой-Тоо, на высоте 3244 м над у. м., почва под ледником, влажность почвы – 100 %, растительности нет. Тип почвы горно-светло-коричневый, с pH 6,5 и температурой 0 °C. Здесь бактериальные сообщества были представлены из филотипа *Actinobacteria*: *Actinobacteria ilicis*, *Ac. oxydans*, *Ac. luteolus* и др., среди которых обнаружен ледниковый вид *Glasiacal icebacterium*.

Видовой состав обнаруженных функциональных групп бактерий дает основание полагать, что в почвах Сон-Кульской долины из-за постоянных низких температур в процесс минерализации органических растительных остатков вовлечена преимущественно психотрофная автохтонная и зимогенная микрофлора, разлагающая остатки за крайне короткий летний период.

Литература

- Grey T. R. G., Williams S. T. Soil microorganisms. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1971. 240 p.
- Høj, L., Olsen, R. A., Torsvik V. L. Effects of temperature on the diversity and community structure of knownmethanogenic groups and other archaea in high arctic peat // ISME J. 2008, Vol. 2. P. 37–48.
- Wilson Z. E.; Brimble M. a Molecules derived from the extremes of life // Nat. Prod. Rep. 2009. Vol. 26. P. 44–71.
- Pulschen A. A., Bendia A. G., Fricker A. D., Pellizari V. H., Galante D., Rodrigues F. Isolation of uncultured bacteria from antarctica using long incubation periods and low nutritional media // Front. Microbiol. 2017. Vol. 8. Art. 1346.

ЭНДОГЕННЫЕ ФТАЛАТЫ В РАСТЕНИЯХ И МИКРООРГАНИЗМАХ – ИНСТРУМЕНТ ЗАЩИТЫ ИЛИ ОРУЖИЕ НАПАДЕНИЯ?

А. Г. Еникеев, А. А. Семенов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, e-mail: enikeev@sifibr.irk.ru

Сложные эфиры *орто*-фталевой кислоты (фталаты) широко используются в химической промышленности в качестве пластификаторов. Годовое производство этих соединений составляет около 5 миллионов тонн. Фталаты повсеместно обнаруживаются в окружающей среде, во всех исследованных живых организмах. Долгое время в научной литературе, особенно в экологической, доминировало мнение о фталатах исключительно как промышленных поллютантах. Вместе с тем фталаты это природные соединения, в больших объемах производимые живыми организмами. Только в растительном покрове Земли (без учета бактерий, грибов и водорослей) одномоментное содержание фталатов превышает их годовое промышленное производство более чем в 36 раз. Результаты большого числа проведенных к настоящему моменту исследований убедительно свидетельствуют о возможности биогенного происхождения фталатов, что позволяет считать дальнейшую дискуссию по этому вопросу лишённой смысла [Roy, 2020; Semenov et al., 2021].

Сведения о влиянии фталатов на живые организмы получены главным образом в модельных экспериментах с синтетическими фталатами. Результаты этих исследований противоречивы и не позволяют сделать однозначных выводов [Matsumoto et al., 2008; Ortiz, Sansinenea, 2018]. Физиологические функции эндогенных фталатов в живых организмах неизвестны, имеются лишь отдельные гипотезы, неподкреплённые достаточными экспериментальными данными.

Фталаты обнаружены во всех исследованных растительных организмах, что может свидетельствовать об их участии в биохимических процессах общих для всех растений [Еникеев и др., 2019; Semenov et al., 2021]. Одной из наиболее вероятных функций этих соединений может быть участие в регуляции растительно-микробных взаимодействий, в частности, в защите от фитопатогенов. Антибактериальное и фунгицидное действие фталатов многократно описано в научной литературе. В то же время, фталаты, аналогичные по составу и содержанию, найдены в грибах и бактериях. Выделенные из бактериальных клеток фталаты угнетали рост бактериальных культур других видов. Установлено, что и растения посредством фталатов могут проявлять аллелопатическую активность, оказывая негативное действие на конкурентные виды [Peakall, 1975; Roy, 2020]. Показано участие фталатов бактерий в формировании растительно-бактериальных симбиозов [Макарова и др., 2012].

Таким образом, одни и те же вещества включены в растениях и микроорганизмах в реализацию противоположно направленных процессов межорганизменных взаимодействий. На уровне современных знаний о метаболизме фталатов интерпретировать эти факты не представляется возможным. Дальнейшие исследования в этом направлении целесообразно сосредоточить на следующих направлениях:

1. В клетках живых организмов фталаты могут находиться в связанной форме, в виде комплекса с другими соединениями, что делает их нетоксичными. Аналогичным образом может осуществляться действие фталатов (образование физиологически активных комплексов).

2. В зависимости от выполняемых функций, фталаты могут включаться в различные метаболические пути. Физиологическое действие фталатов может реализоваться через образование других, в том числе короткоживущих соединений.

3. Фталаты выступают в качестве триггеров запуска ответов клеток на стресс, запуская, в зависимости от ситуации те или иные ответные реакции.

Решение этих задач требует выработки принципиально новых методических подходов, разработки новых экспериментальных моделей. В первую очередь следует четко разграничить эндогенные фталаты, возникающие путем биосинтеза в живых организмах, и, например, наиболее часто упоминаемый в литературе диэтилгексилфталат. Эти соединения могут значительно различаться по составу энантиомеров и, как следствие, по физиологическому действию.

Литература

- Еникеев А. Г., Семенов А. А., Пермяков А. В., Соколова Н. А., Гамбург К. З., Дударева Л. В. Биосинтез диалкиловых эфиров орто-фталевой кислоты в растениях и в культурах клеток // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55, № 3. С. 282–285. <https://doi.org/10.1134/S0555109919020065>
- Макарова Л. Е., Смирнов В. И., Клыба Л. В., Петрова И. Г., Дударева Л. В. Роль аллопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобιοального симбиоза // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С. 394–402.
- Matsumoto M., Hirata-Koizumi M., Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction // Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2008. Vol. 50. P. 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2007.09.004>
- Ortiz A., Sansinenea E. Di-2-ethylhexylphthalate May Be a Natural Product, Rather than a Pollutant // Hindawi Journal of Chemistry. 2018. Vol. 2018. Article ID 6040814. <https://doi.org/10.1155/2018/6040814>
- Peakall D. B. Phthalate esters: Occurrence and biological effects // Residue Reviews. Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment / Gunther F. A., Gunther J. D. (eds). New York : Springer, 1975. Vol. 54. P. 1–41. http://doi.org/10.1007/978-1-4612-9857-1_1
- Roy R. N. Bioactive natural derivatives of phthalate ester // Critical Reviews in Biotechnology. 2020. Vol. 40. P. 913–929. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1789838>
- Seменов А. А., Еникеев А. Г., Бабенко Т. А., Шафикова Т. Н., Горшков А. Г. Phthalates – a strange delusion of ecologists // Theoretical and Applied Ecology. 2021. N 1. P. 16–21. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-016-021>

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ РАЗНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН

Е. А. Зацаринная¹, А. С. Гаськова¹, Н. В. Колупаева²,
Л. В. Колупаева²

¹Рязанский государственный университет им. С. А. Есенина
Рязань, e-mail: microbiog@mail.ru

²Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии, Оболенск

Одной из важных проблем современности является устойчивость бактерий к антимикробным препаратам. В первую очередь это касается возбудителей различных инфекционных заболеваний. Однако, как показывает анализ многочисленных публикаций, антибиотикорезистентные бактерии и гены устойчивости к антибиотикам можно обнаружить практически во всех объектах окружающей среды, особенно в водных экосистемах. Поверхностные водные объекты аккумулируют всевозможные варианты антибиотикоустойчивых бактерий, встречающихся на водосборной территории, за счет поверхностного стока, поступления сточных вод, ливневой канализации, перелетных птиц и других животных [Martinez, 2009; Fahrenfeld et al.,

2013; Huijbers et al., 2015; Furness et al., 2017; Guenther et al., 2017]. Немаловажным фактором в распространении антибиотикоустойчивых бактерий в поверхностных водных объектах является температура воды [Rodríguez-Verdugo et al., 2020], которая значительно различается в различных природно-климатических зонах.

В рамках данного исследования был проведен сравнительный анализ встречаемости антибиотикоустойчивых энтеробактерий, выделенных в Мурманской и Рязанской областях. Из поверхностных водных объектов Рязанской области в 2016–2017 гг. было выделено 2441 изолятов семейства Enterobacteriaceae, в Мурманской области в 2017–2018 гг. – 190 изолятов. Важно отметить, что количество общих и термотолерантных колиформных бактерий в большинстве водных объектов Мурманской области было значительно ниже, чем в Рязанской. Наблюдались отличия в видовом спектре энтеробактерий. Так, в Рязанской области доминировали *Citrobacter* (36 %), *Escherichiacoli* (21 %) и *Providencia* (21 %). В Мурманской области – *Citrobacter* (35 %) и *Enterobacter* (21 %), *E. coli* отмечены единично, только в водных объектах, где имеется непосредственный привнос коммунально-бытовых сточных вод.

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузным методом в соответствии с требованиями МУК 4.2.1980-04 и Клиническим рекомендациям (2014). Уровень устойчивости энтеробактерий к антибиотикам определяли по отношению к 19 препаратам с различным механизмом действия. Интерпретацию данных производили с использованием критериев EUCAST v.7.0 (2017) и программного пакета аналитической системы контроля антибиотикорезистентности WHONET. Фенотипически определяли продукцию бета-лактамаз расширенного спектра методом двойных дисков.

Количественная оценка антибиотикорезистентности показала, что и в Рязанской, и Мурманской областях абсолютно доминируют энтеробактерии, устойчивые к одному и более антимикробному препарату (99,8 и 100 % соответственно). Фенотипом множественной лекарственной устойчивости (MDR, т. е. нечувствительные к препаратам (≥ 1) трех классов АМП) обладали 93,6 % изолятов Рязанской и 94,2 % – Мурманской областей. Однако, если в Рязанской области фенотип MDR имели все изоляты, выделенные в 12 поверхностных водных объектов (из 27 обследованных), то в Мурманской только в двух, где присутствует непосредственный приток сточных вод. Фенотип экстремальной резистентности (XDR, т. е. нечувствительность к препаратам (≥ 1) всех за исключением 1–2 классов АМП) чаще встречается среди энтеробактерий, выделенных из водных объектов Рязанской области (32 и 28 % соответственно).

Рассматривая показатели устойчивости изолятов энтеробактерий к отдельным препаратам, требуется отметить достаточно высокий уровень резистентности к бета-лактамам антибиотикам в обоих районах. В частности, наиболее часто встречается устойчивость к ампициллину (71,7 % изолятов в Рязанской области и 62,6 % – в Мурманской). Однако среди энтеробактерий, выделенных в Мурманской области в два раза реже встречается устойчивость к защищенным пенициллинам – ампициллин/сульбактаму и тикарциллин/клавунату. В обоих регионах почти половина изолятов обладала устойчивостью к цефепиму (IV поколение цефалоспоринов). В то же время устойчивость к цефалоспорином I-III поколения для обоих регионов оказалась значительно ниже, порядка 20–40 %. Принимая во внимание высокую устойчивость выделенных изолятов к бета-лактамам антибиотикам, была выполнена оценка продукции бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Ее результаты показали, что продукция БЛРС обнаружена у 53,6 % всех выделенных в этот период изолятов Рязанской области и 54,4 % – Мурманской области. Среди аминогликозидов наибольшая устойчивость была обнаружена к амикацину (49,5 % – в Рязанской области, 31,9 % – в Мурманской). Чуть более низкий уровень анализируемые колиформные бактерии проявляли в отношении других антибиотиков этой группы: к гентамицину и торбамицину.

В обоих регионах самой эффективной группой АМП, *in vitro* подавляющим рост исследуемых энтеробактерий, были хинолоны. Устойчивость к этой группе не превышала 15 %. Действие тетрациклина на энтеробактерии, выделенные в этих двух регионах, практически не различалось (20,4 и 14,8 % соответственно). К ко-тримаксозолу было резистентно 9,3 % изолятов в Рязанской области и 23,7 % – в Мурманской. К левомицетину – 11,3 % в Рязанской и 23,1 % – в Мурманской областях. Устойчивость к нитрофурантоину, наоборот, в два раза чаще встречалась в Мурманской области, чем в Рязанской (61 и 27,8 % соответственно).

Литература

Fahrenfeld N., Ma Y., O'Brien M., Pruden A. Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: distribution system and irrigation implications // Front. Microbiol. 2013. Vol. 4. Art. 130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130>

Furness L. E., Campbell A., Zhang L., Gaze W. H., McDonald R. A. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance // Environ Res. 2017. Vol. 154. P. 28–34.

Guenther S., Semmler T., Stubbe A., Stubbe M., Wieler L. H., Schaufler K. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds // J. Antimicrob. Chemother. 2017. Vol. 72. P. 1310–1313.

Huijbers P. M. C., Blaak H., de Jong M. C. M., Graat E. A. M., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Husman A. M. dR. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review // *Environ. Sci. Technol.* 2015. Vol. 49. P. 11993–12004.

Martinez J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009. Vol. 276. P. 2521–2530.

Rodríguez-Verdugo A., Lozano-Huntelman N., Cruz-Loya M., Savage V., Yeh P. Compounding Effects of Climate Warming and Antibiotic Resistance // *iScience.* 2020. Vol. 23. Art. 101024. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101024>

ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ МЕХАНИЗМОМ QUORUM QUENCHING

И. В. Злобин, Ю. В. Зайцева
М. Н. Соколов, О. А. Маракаев

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Ярославль, e-mail: ily.zlobin21@yandex.ru

Quorum sensing (QS) – это системы регуляции экспрессии генов у бактерий в зависимости от плотности популяции. Такие системы функционируют благодаря двум основным компонентам: низкомолекулярным веществам, играющим роль сигнальных молекул и белкам – регуляторам транскрипции. У многих грамотрицательных бактерий роль сигнальных молекул играют N-ацилгомосеринлактоны (АГЛ). QS системы, основанные на АГЛ имеют важное значение в регуляции множества процессов в клетке, таких как биолюминисценция, синтез антибиотиков, производство факторов вирулентности, биосинтез экзополисахаридов, подвижность и передачу плазмид при конъюгации.

Нарушение работы QS систем, используемых патогенными бактериями, считается наиболее перспективным методом подавления экспрессии факторов вирулентности и борьбы с бактериальными инфекциями. Процессы, мешающие работе QS, обычно называются Quorum Quenching – «подавление кворума» (QQ) [Dong et al., 2007]. Стратегии биоконтроля, основанные на механизмах QQ, являются перспективными методами, так как они оказывают ограниченное селективное давление на выживание бактерий по сравнению с антибиотиками, не убивая клетки, а всего лишь нарушая экспрессию некоторых генов [Uroz et al., 2009].

Одним из способов ингибирования механизма QS является использование ферментов класса лактоназ. Лактоназы способны катализировать размыкание лактонного кольца. Существует множество АГЛ-лактоназ, принадлежащих к различным группам белков: металло-β-лактамазы, фосфотриэстеразоподобные лактоназы (PLL) и параоксоназы [Billot R. et al., 2020].

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

Для анализа использовали коллекцию ассоциативных микроорганизмов кафедры ботаники и микробиологии ЯрГУ. Для обнаружения сигнальных молекул QS был использован биосенсор *Chromobacterium violaceum* CV026 [McClellan et al., 1997]. Данный штамм способен синтезировать пурпурный пигмент виолацеин в присутствии экзогенных молекул АГЛ с ацильной боковой цепью из четырех-восьми атомов углерода. В качестве модельного вещества был использован N-гекса-ноил-L-гомосеринлактон. Штамм CV026 выращивали при 28 °С в среде LB с добавлением канамицина (20 мг/л) для поддержания плазмиды, несущей ген, ответственный за продукцию виолацеина.

Для анализа лактоназной активности исследуемые культуры выращивали на среде LB с добавлением АГЛ в течение ночи. Затем культуры центрифугировали, переносили супернатант в лунки иммунологического планшета и добавляли равный объем ночной культуры *C. violaceum* CV026. Планшеты инкубировали при 28 °С в течение 48 ч. Отсутствие фиолетовой окраски у биосенсора свидетельствовало о деградации АГЛ. Количественная оценка лактоназной активности производилась спектрофотометрическим методом, основанным на способности лактонов образовывать окрашенные соединения с Fe^{3+} в присутствии гидроксилamina в щелочной среде [Yang et al., 2006]. Идентификацию отобранных штаммов проводили молекулярно-генетическим методом на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК.

В ходе исследования было проверено 65 штаммов бактерий. Идентифицировано 8 штаммов, обладающих лактоназной активностью, представляющих филумы *Firmicutes*, *Actinomycetes* и *Proteobacteria*. Идентификация по гену 16S рРНК показала, что они относятся к родам: *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*. Наибольшей лактоназной активностью обладал штамм *Rhodococcus* sp. VER 34, снизивший концентрацию АГЛ более чем в 2 раза.

Наличие выраженных лактоназных свойств у данных штаммов делает их перспективными объектами для дальнейших исследований. Способность к ферментному разрушению лактонов может быть использована для борьбы с фитопатогенами, экспрессия факторов вирулентности которых регулируется с помощью механизма QS.

Литература

Billot R. et al. Engineering acyl-homoserine lactone-interfering enzymes toward bacterial control // Journal of Biological Chemistry. 2020. Vol. 295. P. 12993–13007.

Dong Y. H., Wang L. H., Zhang L. H. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications // *Philosophical transactions of the Royal Society B: biological Sciences*. 2007. Vol. 362. P. 1201–1211.

McClellan K. H. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // *Microbiology*. 1997. Vol. 143. P. 3703–3711.

Uroz S., Dessaux Y., Oger P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication // *ChemBioChem*. 2009. Vol. 10. P. 205–216.

Yang Y. H. et al. High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications // *Analytical biochemistry*. 2006. Vol. 356. P. 297–299.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ Т-2 ТОКСИНА

Е. А. Ёылдырым¹, А. А. Грозина², Л. А. Ильина¹
В. А. Филиппова¹, Г. Ю. Лаптев¹, Е. С. Пономарева¹
А. В. Дубровин¹, В. В. Молотков¹, Д. Г. Тюрина¹
К. А. Калиткина¹

¹ООО «БИОТРОФ+», e-mail: deniz@biotrof.ru

²Всероссийский научно-технологический институт
птицеводства РАН, Сергиев Посад
e-mail: alena_fisinina@mail.ru

Большой интерес представляют исследования, направленные на выявление специфических микробных биомаркеров пищеварительной системы сельскохозяйственной птицы, в том числе тех, которые связаны с продуктивностью, заболеваниями и интоксикацией ксенобиотиками кормов. С одной стороны, под влиянием микотоксинов кормов микробиота кишечника может прийти в состояние дисбаланса, с другой стороны, микроорганизмы могут стать перспективной мишенью для терапевтической профилактики микотоксикозов. Поэтому важно охарактеризовать бактериальные популяции, вовлеченные в дисбактериоз, возникающий при контаминации кормов микотоксинами, так как это может быть полезно для поиска мер профилактики микотоксикозов.

Материалы и методы исследования. В данном исследовании оценивалось влияние рациона, искусственно контаминированного Т-2 токсином, на состав микробиомаслепых отростков кишечника бройлеров кросса «Смена-8». Опыт проводили на 33-дневных цыплятах-бройлерах в течение 14 сут. В зависимости от концентрации добавляемого Т-2 токсина были сформированы 4 опытные группы (по 5 цыплят в каждой группе): I контрольная, получавшая рацион без загрязнения Т-2 токсином, II опытная – получавшая рацион с добавлением

T-2 токсина в концентрации 100 мкг/кг, III опытная – 200 мкг/кг, IV опытная – 400 мкг/кг. Геномную ДНК содержимого слепой кишки цыплят-бройлеров экстрагировали и амплифицировали путем секвенирования 16S рРНК NGS с помощью секвенатора Miseq (Illumina, США) с применением праймеров для V3-V4 региона 16S рРНК: прямой праймер – 5'TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG – 3', и обратный праймер – 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC.

Результаты исследования показали, что в целом в образцах было обнаружено 18 филумов микроорганизмов, в частности, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Poribacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Thermotogae*, *Verrucomicrobia*, а также кандидатные филумы WPSU *unclassified* и *Candidatus Saccharibacteria* и неклассифицируемые *Thermus*.

Часть микроорганизмов по сравнению с контрольной группой полностью исчезала, а часть, наоборот, появлялась при загрязнении корма T-2 токсином. В кишечнике цыплят всех опытных групп (II, III, IV) с введением токсина появились представители семейства *Mycoplasmataceae* и кандидатного филума *Candidatus Saccharibacteria*. В то же время, в кишечнике цыплят контрольной группы I эти микроорганизмы отсутствовали. Под влиянием T-2 токсина увеличилось среднее количество представителей семейства *Mycoplasmataceae*, среди которых часто встречаются возбудители заболеваний птиц ($p \leq 0,05$) [Stipkovits et al., 2012]. Численность бактерий семейства *Mycoplasmataceae* во II, III, IV опытных группах составила $0,0063 \pm 0,00032$, $0,0093 \pm 0,00056$ и $0,0130 \pm 0,00075$ % соответственно.

В то же время представители других семейств (в том числе *Anaerolineaceae*, *Dermatophilaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Rickettsiaceae*, *Neisseriaceae*), представленные в контрольной группе, полностью исчезали из кишечника цыплят при загрязнении T-2 токсином во всех опытных группах (II, III, IV).

Таким образом, можно сделать вывод, что T-2 токсин провоцирует дисбактериоз в кишечнике кур.

Количество представителей семейства *Lactobacillaceae*, традиционно считающихся полезными для здоровья кишечника, возросло ($p \leq 0,05$) в зависимости от увеличения дозы микотоксина – во II, III, IV опытных группах оно было выше, чем в контроле, на 31, 6, 45, 6 и 46,3 % соответственно. По всей вероятности, лактобациллы более устойчивы к микотоксинам, чем другие представители микробиоты.

Это может быть связано с тем, что *Lactobacillaceae* могут играть роль в процессе детоксикации микотоксинов [Jin, 2001].

По нашему мнению, такие таксоны, как *Lactobacillaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Anaerolineaceae*, *Dermatophilaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Rickettsiaceae*, *Neisseriaceae* являются индикаторными группами микроорганизмов, которые могут быть значимыми биомаркерами Т-2 токсикозов у сельскохозяйственной птицы.

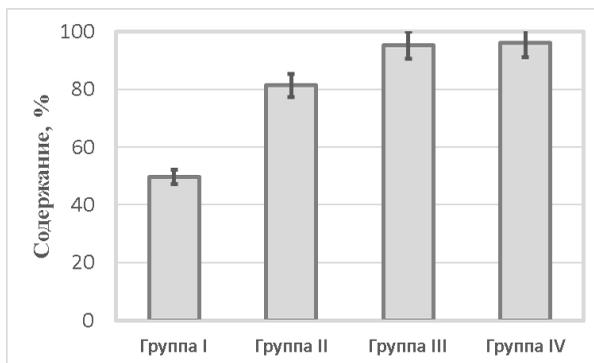


Рис. Содержание бактерий семейства *Lactobacillaceae* в слепых отростках кишечника бройлеров кросса «Смена 8» при экспериментальном Т-2 токсикозе методом NGS-секвенирования, $N = 3$

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 20-76-10003.

Литература

Stipkovits L., Glavits R., Palfi V., Beres A., Egyed L., Denes B., Somogyi M., Szathmary S. Pathologic lesions caused by coinfection of *Mycoplasma gallisepticum* and H3N8 low pathogenic avian influenza virus in chickens // *Vet Pathol.* 2012. Vol. 49, N 2. P. 273–83. <https://doi.org/10.1177/0300985811415702>

Jin J., Beekmann K., Ringoe E., Rietjens I., Xing F. Interaction between food-borne mycotoxins and gut microbiota: A review // *Food Control.* 2021. Vol. 126. Art. 107998, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107998>

РОЛЬ АЛАРМОНА (P)PPGPP В РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ ИНДОЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КУЛЬТУРЕ *ESCHERICHIA COLI*

Н. М. Кашеварова¹, А. Г. Ткаченко²

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН
Пермь, e-mail: nkashev@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет
Пермь, e-mail: agtkachenko@iegm.ru

Индол – ароматическая сигнальная молекула, продуцируемая более чем 85 видами бактерий – привлекает внимание исследователей на протяжении более 100 лет благодаря его значительному влиянию на различные аспекты физиологии бактерий, включая биопленкообразование, антибиотикорезистентность, вирулентность, образование персистеров, подвижность [Kim, Park, 2015]. Показано, что *E. coli* продуцирует миллимолярные концентрации индола в стационарной фазе роста с участием триптофаназы TnaA и транспортного белка TnaB в условиях избыточного содержания питательных веществ, что также может быть связано со стрессовым ответом [Vega et al., 2012]. Другая универсальная сигнальная молекула (p)ppGpp является ключевым компонентом стринджен-ответа – регуляторного механизма бактерий при адаптации к различным стрессовым воздействиям. Алармон (p)ppGpp принимает участие в регуляции множества процессов в бактериальной клетке, включая транскрипцию, белковый и нуклеотидный синтез, репликацию, фосфатный метаболизм. Показано, что он играет ключевую роль в бактериальной вирулентности и персистенции [Naurlyuk et al., 2015]. Анализируя литературу, можно сделать вывод, что обе сигнальные молекулы – алармон (p)ppGpp и индол (продукт катаболизма аминокислоты триптофана) – регулируют сходные физиологические процессы в бактериальных клетках. Было высказано предположение о существовании связи между стринджен-ответом и индольным сигналом [Liu et al., 2017]. В связи с этим целью данной работы являлось изучение влияния регулятора стринджен-ответа (p)ppGpp на продукцию индола клетками *E. coli*. Поскольку ответственными за поддержание определенного уровня (p)ppGpp в клетках *E. coli* являются белки RelA и SpoT, нами сконструирован делеционный мутант по 2 генам *ΔrelA ΔspoT*, кодирующим основные ферменты синтеза (p)ppGpp.

В данной работе изучена динамика накопления индола в периодических культурах *E. coli* BW25141 ((p)ppGpp⁺) и BW25141 *ΔrelA*

$\Delta spoT$ ((r) $ppGpp^r$) в глюкозо-минеральной среде M9, лишенной триптофана (контроль), и с добавкой экзогенного триптофана (2 мМ) на протяжении 168 ч культивирования (рис.). С целью выяснения эффекта стресса голодания на выработку индола бактериальными клетками использовали модель лимитирования роста углеродным субстратом в условиях периодического культивирования *E. coli* при двух концентрациях глюкозы – 0,1 % и 0,4 %. Концентрацию индола в среде определяли методом ВЭЖХ [Нестерова и др., 2021].

При росте родительского штамма *E. coli* BW25141 в минимальной среде M9 (без триптофана) с добавкой 0,4 % глюкозы внеклеточный индол начинал обнаруживаться только после 24 ч культивирования, с достижением максимальных значений к 96 ч, после чего его содержание в среде оставалось на постоянном уровне (около 20 мкМ) (рис., а). В то же время в культуре делеционного мутанта на протяжении 120 ч культивирования уровень внеклеточного индола варьировал в диапазоне 0,1–0,5 мкМ и только к 168 ч достигал 1,7 мкМ. Таким образом, отсутствие (r) $ppGpp$ снижало продукцию индола примерно в 10 раз в среде с добавкой 0,4 % глюкозы. В условиях лимитирования субстрата (0,1 % глюкозы) отмечалось снижение содержания внеклеточного индола, продуцируемого клетками (r) $ppGpp^+$ штамма, в 6 раз. Продукция индола в культуре нокаутированного мутанта была сходна с таковой при 0,4 % содержании глюкозы.

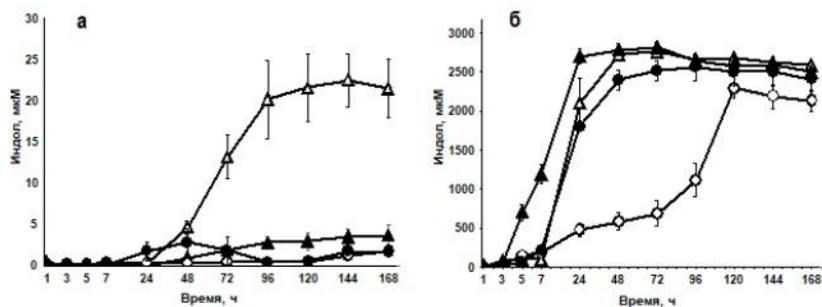


Рис. Продукция индола в культурах BW25141 (треугольники) и делеционного мутанта BW25141 $\Delta relA\Delta spoT$ (круги) при содержании 0,4 % и 0,1 % глюкозы (незакрашенные и закрашенные символы, соответственно) при росте в среде без триптофана (а) и с добавкой 2 мМ триптофана (б)

Экзогенная добавка 2 мМ триптофана приводила к накоплению индола в культуре *E. coli* BW25141 до 2,7 мМ (рис., б). При этом в среде с 0,1 % глюкозой рост концентрации индола наблюдался после

3 ч культивирования, тогда как в среде с 0,4 % глюкозой – после 7 ч. Это обусловлено появлением в клетках сAMP как признака начала лимитирования роста субстратом, поскольку экспрессия триптофанозного оперона, ответственного за синтез индола, имеет сAMP-зависимый характер [Wood, 2016]. Вследствие того, что образование сAMP индуцируется истощением глюкозы, задержка синтеза индола пропорциональна ее концентрации в среде. В то же время нами показано, что делеционный мутант также демонстрирует значительную задержку продукции индола по сравнению с родителем пропорционально концентрации глюкозы. Следовательно, не только сAMP, но и (p)ppGpp участвуют в регуляции синтеза индола. Это свидетельствует о возможности синергического эффекта двух регуляторных молекул на продукцию индола, на что указывают данные о стимулирующем эффекте сAMP на синтез белка RelA [Amato et al., 2013].

Таким образом, нами было показано, что отсутствие (p)ppGpp, так же как и низкое содержание глюкозы снижало продукцию индола в безтриптофановой среде M9. Однако в присутствии избыточного количества триптофана показана прямая зависимость времени задержки начала образования индола от концентрации глюкозы, более выраженная в культуре мутанта, неспособного к синтезу (p)ppGpp. Полученные данные можно объяснить комплексным регуляторным воздействием механизма катаболитной репрессии и алармона (p)ppGpp на уровень экспрессии триптофанозного оперона *tnaCAB*, что приводит к накоплению индола.

Литература

- Нестерова Л. Ю., Ахова А. В., Ткаченко А. Г. Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикочувствительность *Escherichia coli* // Вестник Московского университета. Сер. 16, Биология. 2021. Т. 76. С. 219–224.
- Amato S. M., Orman M. A., Brynildsen M. P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli* // Molecular Cell. 2013. Vol. 50. P. 475–487.
- Hauryliuk V., Atkinson G. C., Murakami K. S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology // Nature Reviews Microbiology. 2015. Vol. 13. P. 1–12.
- Kim J., Park W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? // Journal of Microbiology. 2015. Vol. 53. P. 421–428.
- Liu S., Wu N., Zhang S., Yuan Y., Zhang W., Zhang Y. Variable persister gene interactions with (p)ppGpp for persister formation in *Escherichia coli* // Frontiers in Microbiology. 2017. Vol. 8. Art. 1795.
- Vega N., Allison K., Khalil A., Collins J. Signaling-mediated bacterial persister formation // Nature Chemical Biology. 2012. Vol. 8. P. 431–433.
- Wood T. K. Combatting bacterial persister cells // Biotechnology and Bioengineering. 2016. Vol. 113. P. 476–483.

СТИМУЛЯЦИЯ ПИГМЕНТООБРАЗОВАНИЯ В МИЦЕЛИИ ГРИБОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И. А. Козлова¹, Е. В. Федосеева², В. А. Терехова¹

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, e-mail: vterekhova@gmail.com

²Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
Москва, e-mail: elenfedoseeva@gmail.com

Меланин – это уникальный пигмент с множеством функций, который присутствует во всех биологических царствах. Некоторые виды грибов продуцируют темно-коричневый пигмент, известный как меланин. Нейтрализуя окислители, образующиеся в ответ на стресс, меланины играют большую роль в способности грибов противостоять неблагоприятным условиям. У меланизированных грибов, как правило, этот пигмент расположен во внешнем слое клеточной стенки, связанном с хитином, выполняя своего рода барьерную функцию для грибной клетки. Меланин – это аморфный полимер, который производится одним из двух путей. Грибы могут синтезировать меланин из эндогенного субстрата через промежуточный 1,8-дигидрокси-нафталин (DHN). Кроме того, некоторые грибы производят меланин из L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-DOPA). Кластеры генов биосинтеза меланина были охарактеризованы у нескольких грибов. У *Aspergillus fumigatus* кластер состоит из шести генов и охватывает 19 пар нуклеотидов ДНК, у *Penicillium marneffeii* – кластер генов биосинтеза меланина охватывает 25,3 пар нуклеотидов и содержит ген, модифицирующий ферменты и гипотетические белки. Подробная химическая структура меланина неизвестна. Однако микроскопические исследования показывают, что в целом он имеет зернистую структуру. У грибов гранулы меланина локализованы на клеточной стенке, где они, вероятно, связаны с полисахаридами. Недавние исследования показывают, что меланин грибов может синтезироваться во внутренних пузырьках, подобных меланосомам млекопитающих, и транспортироваться к клеточной стенке [Eisenman, Casadevall, 2012].

Меланины повышают вирулентность грибов путем снижения их чувствительности к окислительным условиям среды, создаваемым организмом-хозяином. Мутации по генам синтеза меланина снижают как устойчивость к окислительному стрессу, так и вирулентность [Pombeiro-Sponchiado et al., 2017]. Показано, что в неблагоприятных условиях, в частности, в почвах промышленных и придорожных тер-

риторий увеличивается доля темных меланинсодержащих грибов, таких как *Cladosporium* и *Alternaria*, которые более устойчивы к загрязнению тяжелыми металлами (ТМ) и ненасыщенными углеводородами. Загрязнение радионуклидами также привело к изменению грибных сообществ с увеличением доли меланизированных грибов. Например, было обнаружено, что меланизированные виды грибов, такие как *Cladosporium* spp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans* *Hormoconis resinae*, колонизируют стены поврежденного реактора в Чернобыле, где они подвергаются сильному постоянному радиационному полю [Dadachova et al., 2012]. Исследования *in vitro* показали, что меланизированные грибы более устойчивы к повреждению, вызванному УФ-светом и окислителями, экстремальным температурам, гидролитическим ферментам, токсичности ТМ и антимикробным препаратам, чем немеланизированные [Pombeiro-Sponchiado et al., 2017].

Недостаточно исследовано влияние состава среды и условий культивирования на продукцию пигмента в грибах, которые в нормальных условиях генетически не предрасположены к синтезу меланина. В нашей работе в условиях культивирования микромицетов на питательном агаре Чапека исследовали изменения культурально-морфологических свойств колоний некоторых видов в присутствии экстремально высокого содержания соли свинца (Pb). Свинец в форме соли $Pb(NO_3)_2$ добавляли в расплавленный агар Чапека в концентрации 160 мг Pb/дм³.

Скорость роста грибных колоний на среде без и с добавлением свинца не различалась. Однако при высоком содержании Pb отмечены существенные изменения в морфологии колоний. Так на меланизированных 10–14 сут. колониях альтернарии хорошо заметны были зоны лизиса мицелия, которые свидетельствуют об активации комплекса гидролитических ферментов. В то же время колонии *Penicillium ochrochloron* Biourge, имевшие в контроле на агаре Чапека все характерные таксономические признаки (колонии войлочные до шерстистых, с вторичным ростом вегетативных гиф, реверс бежевый до телесного цвета, спороношение в оливково-зеленых тонах), в присутствии свинца образовывали в центральной и средней части обширные зоны пигментации темно-коричневого цвета. Известно, что при совместном культивировании с другими микроорганизмами, в частности с *Bacillus subtilis*, этот вид гриба продуцирует много новых метаболитов [Eze et al., 2021].

Таким образом, присутствие ТМ способно не только менять соотношение долей меланизированных и немеланизированных форм грибов при загрязнении среды [Terekhova, 2007; Terekhova et al., 2021], но и индуцировать синтез меланина в гиалиновом (неокрашенном) мицелии. Аналогично этому появление меланинов было отмечено у светлоокрашенных грибов *Paecilomyces lilacinus*, распространенных в зоне Чернобыльской АЭС. Поскольку меланин не только важный участник процесса взаимодействия патогенных грибов и организма хозяина, но представляет значительный биотехнологический интерес, [Eisenman, Casadevall, 2012; Pombeiro-Sponchiado et al., 2017], то установленный нами факт образования в чистой культуре в присутствии соли свинца меланина у грибов, для которых в нормальных условиях пигментобразование в мицелии не характерно, является дополнительным свидетельством влияния конкретных условий среды.

Исследование выполняется в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М. В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды» и поддерживается грантом РНФ 22-24-00666 «Меланиносодержащие грибы техногенно нарушенных почв: индикация химического загрязнения и биотехнологический потенциал».

Литература

- Dadachova E., Bryan R. A., Howell R. C., Schweitzer A. D., Aisen P., Nosanchuk J. D., Casadevall A. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement // *Pigment cell & melanoma research*. 2008. Vol. 21. P. 192–199.
- Eisenman H. C., Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin // *Applied microbiology and biotechnology*. 2012. Vol. 93. P. 931–940.
- Eze P. M., Gao Y., Liu Y., van Gellen L. et al. Secondary metabolites of a marine-derived *Penicillium ochrochloron* // *Notulae Scientia Biologicae*. 2021. Vol. 13. Art. 11020. doi:10.15835/nsb13311020
- Gessler N. N., Egorova A. S., Belozerskaya T. A. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. Vol. 50. P. 105–113. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020094>
- Pombeiro-Sponchiado S. R., Sousa G. S., Andrade J. C., Lisboa H. F., Gonçalves R. C. Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications // *Melanin*. 2017. P. 47–75.
- Terekhova V. A. The importance of mycological studies for soil quality control // *Eurasian Soil Science*. 2007. Vol. 40. P. 583–587
- Terekhova V. A., Fedoseeva E. V., Belfeg J. V., Kiryushina A. P., Rychagova A. G., Verkhovtseva N. V. Structure of microbial complexes in modelling of polymetallic pollution and remediation of agrosoddy-podzolic soils // *Moscow University Soil Science Bulletin* 2021. Vol. 76. P. 33–40.

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* В ХОДЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А. С. Кокорева¹, Н. Н. Гесслер², Е. П. Исакова², Ю. И. Дерябина²

¹Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева
Москва, e-mail: kokoreva2013@list.ru

²Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, ФИЦ биотехнологии РАН
Москва, e-mail: yul_der@mail.ru

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* способны расти на различных органических субстратах и активно используются для ремедиации почв и водных сред, загрязненных нефтепродуктами или отходами масложировой промышленности. Эти дрожжи находят применение в биотехнологии в производстве органических кислот и рекомбинантных белков. Экстремофильные дрожжи *Y. lipolytica* способны расти в широком диапазоне pH, обладают гибкой системой редокс-адаптации, позволяющей эффективно переносить повышение уровня генерации активных форм кислорода (АФК) в клетках без заметного влияния на рост культуры. Это делает их перспективным объектом для использования в качестве промышленного продуцента [Sekova, 2019].

Известно, что в процессе длительного культивирования на фоне исчерпания субстратов наблюдается повышение уровня АФК и развитие окислительного стресса, что приводит к возникновению различных повреждений и старению культуры. Значительная роль в развитии этих процессов связана с нарушением митохондриальных процессов и снижением энергизации клеток [Dahiya, 2020]. Потенциально высокая адаптационная способность дрожжей *Y. lipolytica* к окислительному стрессу позволяет поставить вопрос о механизмах поддержания ее жизнеспособности при лимитировании субстратов в процессе длительного культивирования. В связи с этим, целью работы являлось изучение динамики некоторых физиологических и биохимических характеристик дрожжей *Y. lipolytica* в ходе продолжительного культивирования.

В работе использовали штамм *Y. lipolytica* W29 (дикий тип), полученный из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция). Дрожжи растили на жидкой и твердой полусинтетической среде, содержащей в качестве источника углерода 1% глицерин [Sekova, 2019].

В процессе длительного культивирования способность к колониеобразованию снижалась на 15 % только к концу 4 недели, что указывает на их высокий жизненный потенциал. Исследование дыхания

клеток полярографическим методом на протяжении 8 недель показало значительное снижение дыхательной активности и возрастание доли цианид-резистентного дыхания (рис. 1). Снижение дыхательной активности было сопряжено с уменьшением уровня АФК в клетках, которое мы анализировали флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного красителя эфира дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (ДХФДА). В то же время цитометрическое исследование нативных клеток с пропидием йодидом показало их высокую жизнеспособность на протяжении всего времени культивирования (более 98%). Цитометрия фиксированных образцов с окраской йодидом пропидия позволила показать, что в логарифмической стадии культивирования (18 ч) клетки распределялись между состояниями G1/G0 и G2/M примерно поровну, а в стадии стационарного роста происходило увеличение доли клеток в G1/G0 и снижение доли клеток в G2/M до 1 % к концу 8-й недели культивирования (рис. 2). Использование митотрекеров Green и Red выявило снижение энергизации митохондрий на порядок после 5 сут. культивирования.

На основании полученных данных мы предполагаем, что основная масса клеток к концу 8 недель культивирования находится в состоянии G1/G0 на фоне снижения дыхательной активности и энергизации митохондрий. Несмотря на отсутствие субстрата клетки сохраняют высокую жизнеспособность и способность к образованию колоний. Таким образом, в ходе длительного культивирования на фоне истощения субстрата дрожжи *Yarrowia lipolytica* проявляют высокую жизнеспособность.

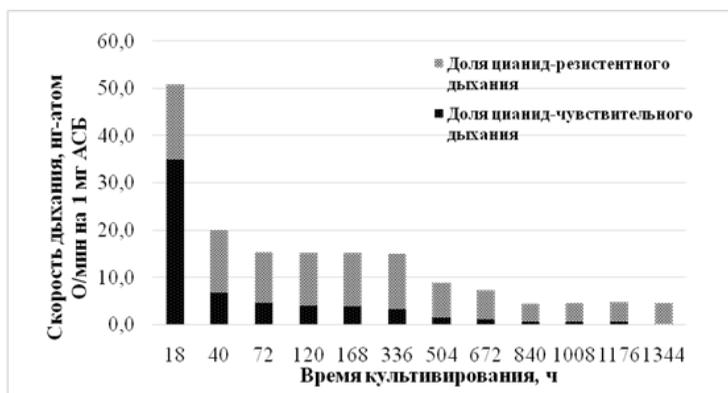


Рис. 1. Определение дыхательной активности и цианид-резистентного дыхания дрожжей *Yarrowia lipolytica* при культивировании на 1%-ном глицерине в течение 8 недель

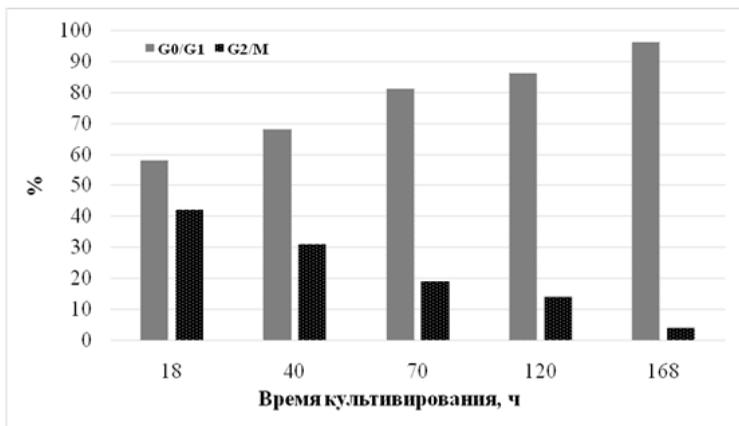


Рис. 2. Динамика изменения клеточного цикла дрожжей *Yarrowia lipolytica* при длительном культивировании на 1%-ном глицерине в течение 168 ч

Литература

Dahiya R., Mohammad T., Alajmi M. F., Rehman Md. T., Hasan G. M., Hussain A., Hasan Md. I. Insights into the Conserved Regulatory Mechanisms of Human and Yeast Aging // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. Art. 882. <https://doi.org/10.3390/biom10060882>

Sekova V. Yu., Dergacheva D. I., Isakova E. P., Gessler N. N., Tereshina V. M., Deryabina Y. I. Soluble sugar and lipid readjustments in the *Yarrowia lipolytica* yeast at various temperatures and pH // *Metabolites*. 2019. Vol. 9. Art. 307. <https://doi.org/10.3390/metabo9120307>

АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Л. И. Кононова¹, Л. М. Лемкина¹, В. П. Коробов^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
Пермь, e-mail: kononova_l@iegm.ru

² Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь

Метициллинрезистентные коагулазопозитивные стафилококки, как обладающие множественной устойчивостью, включены в список приоритетных бактериальных патогенов [World Health Organization, 2021]. Однако известно, что частота выявлений метициллинрезистентности (оксациллинрезистентности) среди коагулазонегативных стафилококков (КНС) намного превышает таковую среди штаммов *S. aureus*. Штаммы КНС обладают также более высокой устойчиво-

стью к антибиотикам, дезинфектантам и антисептикам, и характеризуются также высокой способностью к образованию биопленок [Becker et al., 2014]. Возрастающая роль КНС, как возбудителей внутрибольничных инфекций, требует более пристального контроля, поскольку эта группа микроорганизмов недостаточно охвачена соответствующим вниманием исследователей.

Целью работы явилось изучение *in vitro* антибактериальной активности оксациллина, ванкомицина, даптомицина, линезолида и лантибиотика варнерина в отношении клинических штаммов КНС и выявление корреляции устойчивости этих штаммов с наличием в их клеточных мембранах фосфолипида лизилфосфатидилглицерина.

Материалы и методы. Объектами исследования служили штаммы КНС, выделенные от пациенток родильных домов г. Перми в 2015–2016 гг. Чувствительность бактерий к антибиотикам оксациллину, ванкомицину, даптомицину и лантибиотику варнерину [Коробов и др., 2010] определяли стандартным методом серийных разведений; к линезолиду – дискодиффузионным методом. Выявление штаммов КНС с пониженной чувствительностью к ванкомицину проводили с помощью популяционного анализа [Hanaki, Hiramatsu, 2001]. Анализ липидов бактерий проводили с помощью тонкослойной хроматографии [Кейтс, 1975].

Результаты и обсуждение. Показана высокая антибактериальная активность ванкомицина, даптомицина и линезолида в отношении клинических штаммов КНС. Обнаружено, что оксациллин и варнерин обладают меньшей активностью (табл. 1).

Таблица 1

Чувствительность использованных в работе коагулазонегативных тафилококков ($n = 47$) к антибиотикам

Антибиотик	Диапазон значений МИК (мкг/мл)	% чувствительных	МИК (мкг/мл)	
			50 %	90 %
Ванкомицин	0,5 – 4	100	2	4
Оксациллин	$\leq 0,25 - \geq 512$	29,8	32	≥ 512
Даптомицин	$\leq 0,25 - 4$	88	0,5	1
Варнерин	$\leq 0,25 - \geq 512$	6,4	8	64
Линезолид	$\leq 4 - \geq 8$	80,9	≤ 4	≥ 8

Для оксациллинрезистентных штаммов показано возрастание минимальных ингибиторных концентраций (МИК) ванкомицина, даптомицина и варнерина. Среди штаммов, обладающих верхним пределом чувствительности к ванкомицину (4 мкг/мл), не обнаружено чувствительных к оксациллину и варнерину.

При исследовании мембранных липидов клинических стафилококков выявлено наличие в них лизилфосфатидилглицерина (лизил-ФГ+) у преобладающего большинства штаммов, для которых характерно кроме устойчивости к варнерину и снижение чувствительности ко всем исследуемым антибиотикам в сравнении со стафилококками, не содержащими в липидном составе этого фосфолипида (лизил-ФГ-) (табл. 2).

Таблица 2

Чувствительность к антибиотикам коагулазонегативных стафилококков ($n = 47$) в зависимости от наличия лизилфосфатидилглицерина (лизил-ФГ)

Антибиотик	Диапазон значений МИК (мкг/мл)	% чувствительных	МИК (мкг/мл)	
			50 %	90 %
Штаммы, лизил-ФГ – ($n = 3$)				
Оксациллин	$\leq 0,25 - 4$	66,7	$\leq 0,25$	4
Даптомицин	$\leq 0,25 - 1$	100	0,5	1
Ванкомицин	$\leq 0,25 - 1$	100	0,5	1
Варнерин	$\leq 0,25$	100	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$
Линезолид	≤ 4	100	≤ 4	≤ 4
Штаммы, лизил-ФГ + ($n = 44$)				
Оксациллин	$\leq 0,25 - \geq 512$	25	64	≥ 512
Даптомицин	$\leq 0,25 - 4$	88,6	0,5	2
Ванкомицин	0,5 – 4	100	2	4
Варнерин	1 – ≥ 512	0	8	64
Линезолид	$\leq 4 - \geq 8$	75,9	≤ 4	≥ 8

Установлено, что при адаптации бактерий КНС к ванкомицину возрастает содержание лизилфосфатидилглицерина в их липидном спектре, что приводит к «разбавлению» общего отрицательного заряда клеточных поверхностей и снижению родства к катионным антибактериальным соединениям. Поэтому перспективным направлением борьбы с полирезистентными КНС может являться воздействие на один из ключевых факторов вирулентности бактерий – белок MprF (multiple peptide resistance factor) [Ernst, Peschel, 2011], являющийся лизилфосфатидилглицеринсинтазой. Выявленный, и, по-видимому, широко распространенный феномен гетерорезистентности клинических КНС к ванкомицину также приближает их по опасным свойствам к золотистым стафилококкам.

Заключение. Преобладание метициллинрезистентного фенотипа клинических КНС, а также гетерорезистентный характер их устойчивости к ванкомицину и наличие принципиального липида, лизилфосфатидилглицерина, требует разработки новых методологий детекции инфекций, вызванных коагулазонегативными стафилококками.

Литература.

- Becker K., Heilmann C., Peters G. Coagulase-negative staphylococci // *Clin Microbiol Rev.* 2014. Vol. 27, N 4. P. 870–926.
- Ernst C. M., Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids // *Mol Microbiol.* 2011. Vol. 80, N 2. P. 290–299.
- Hanaki H., Hiramatsu K. Detection methods of glycopeptideresistant *Staphylococcus aureus* I: Susceptibility testing // *Antibiotic Resistance. Methods in Molecular Medicine™* / ed. S. H. Gillespie. Humana Press, 2001. P. 85–92.
- World Health Organization. 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Antimicrobial Resistance Division. Geneva, Switzerland, 2021. 76 p.
- Кейте М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М. : Мир, 1975. 326 с.
- Коробов В. П., Лемкина Л. М., Поллодова Т. В., Акименко В. К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // *Микробиология.* 2010. Т. 79, № 2. С. 228–238.

ПОВЫШЕННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ПОКОЯЩИХСЯ УЛЬТРАМИКРОФОРМ БАКТЕРИЙ КАК АДАПТАЦИЯ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ АНТАРКТИЧЕСКИХ ПОЧВ

А. Г. Кудинова, М. А. Петрова

Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», Москва, e-mail: alina-kudinova91@mail.ru

Известно, что бактерии способны осуществлять множество стратегий выживания в неблагоприятных условиях окружающей среды [Chattopadhyay, 2006; Vej, 2009]. Одной из таких стратегий является переход в покоящееся, или дорматное состояние. Однако существует гипотеза, что в почве, особенно в условиях ограничения ресурсов, значительная часть клеток находится в состоянии покоя, которое характеризуется именно уменьшением размеров клеток [Demkina, 2000; Mulyukin, 2009].

При исследовании микробных сообществ антарктических почв было отмечено, что значительная часть клеток (до 70–80 % от общего числа бактерий в образце) представлена мелкими формами, проходящими через фильтры с размерами пор 200 нм [Kudinova, 2015], далее данную фракцию бактерий мы называем фракцией фильтрующихся форм бактерий (ФФБ). Однако оставалось невыясненным, состоит ли фракция ФФБ в антарктических почвах из истинных ультрамикробактерий (облигатных ультрамикробактерий, поддерживающих небольшие объемы клеток независимо от условий их роста) или это именно покоящиеся клетки. Также оставалась неясной функциональная роль микрорформ в адаптации бактерий к экстремальным условиям.

Для исследования этих вопросов, нами была запущена бактериальная сукцессия в почвах из оазиса Холмы Бангера. Данный оазис является одной из самых больших территорий Антарктиды свободных ото льда. Из-за труднодоступности оазиса, это место является уникальным с точки зрения изучения наименее затронутых человеком экосистем. Для инициирования сукцессии были выбраны 3 образца почв: образец криометаморфической почвы под содовой коркой и 2 образца из почвенного профиля, поверхность которого была покрыта моховым покровом. Каждый образец почвы инкубировали при 5 °С и при 20 °С. Отбор проб проводили в 8 контрольных точках: в исходных образцах (0) и на 4, 7, 14, 30, 60, 90, 120 сут. сукцессии. В каждой из этих проб определяли общее количество клеток и количество клеток во фракции ФФБ, а также выделяли общую геномную ДНК из почвы и из фильтрата и с помощью высокопроизводительного секвенирования определяли таксономическое разнообразие микробного сообщества, как в почве, так и во фракции ФФБ.

В результате проведенного исследования было обнаружено, что динамика общей численности бактерий и динамика численности ФФБ имели волнообразный характер по ходу сукцессии, и эти колебания происходили в противоположных направлениях: когда общая численность клеток обычного размера достигала максимума, для клеток из фракции ФФБ была зафиксирована минимальная численность, и наоборот. Это может быть связано с недостатком питательных веществ в образцах – клетки оживают с увеличением содержания влаги в почве и повышением температуры, но вновь впадают в покоящиеся состоянии из-за голодания.

Распределение соотношений филумов в исследованных образцах практически не менялось по ходу сукцессии и не зависело от температуры инкубации. Доминирующими филумами в образцах почв были *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*. Фракция клеток ФФБ представлена теми же филогенетическими группами, что и фракция клеток обычного размера, только соотношение доминирующих филумов было иным: доминировали такие филумы как *Proteobacteria*, *Chloroflexi* и *Actinobacteria*. По ходу сукцессии фракция ФФБ все больше обогащалась представителями филума *Proteobacteria*.

При анализе разнообразия на более низком чем филумы уровне, было обнаружено, что каждая из изученных фракций (все клетки в почве и отдельно ФФБ) обладает своим спектром доминирующих операционных таксономических единиц (ОТЕ). Не все доминирующие в почве ОТЕ также являются доминирующими во фракции ФФБ и наоборот. Если на уровне филумов прослеживается схожесть между фракциями, то на уровне порядков и родов разница между фракциями увеличивается.

На основе данных, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования, были подсчитаны индексы α - и β -разнообразия. Так, индекс Шеннона как во фракции клеток обычного размера, так и во фракции ФФБ незначительно менялся по ходу сукцессии. Самое разнообразное микробное сообщество было обнаружено в верхнем горизонте профиля под моховым покровом в точке сукцессии 120 дней, в этом образце обнаруживалось и наибольшее количество органического вещества. В целом индекс разнообразия для фракции ФФБ был несколько ниже, чем для всего сообщества.

Результаты анализа невзвешенного UniFrac показали, что фракции клеток обычного размера имеют схожую таксономическую структуру, напротив, микробиомы из фракции ФФБ формируют отдельную более разреженную группу, а значит, значительно отличаются друг от друга и от фракции клеток обычного размера и, следовательно, она представляет собой более динамическую, более быстро меняющуюся, по сравнению с клетками обычного размера, фракцию клеток. По-видимому, это происходит за счет того, что часть клеток постоянно переходит в покоящиеся состояние и выходит из него в зависимости от складывающихся условий окружающей среды.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что полученный нами фильтрат из антарктических почв в большей степени состоит из клеток, покоящихся («голодающих») форм бактерий, нежели из облигатных ультрамикробактерий. Можно также предположить, что такие мелкие покоящиеся формы бактерий являются пулом клеток, который позволяет микробному сообществу сохраняться в устойчивом состоянии в неблагоприятных условиях внешней среды. Вероятно, быстрый переход клеток активной части популяции бактерий в мелкие покоящиеся формы является одной из стратегий выживания в экстремальных условиях.

Литература

- Chattopadhyay M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature // Journal of Biosciences. 2006. № 31. P. 157–165.
- Bej A. K., Mojib N. Cold adaptation in Antarctic biodegradative microorganisms // In Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments. CRC Press (Taylor & Francis Group): Boca Raton, FL, USA, 2009. P. 157–177.
- Demkina E. V., Soina V. S., Zvyagintsev D. G., El'-Registan G. I. Reproductive resting forms of *Arthrobacter globiformis* // Mikrobiologiya. 2000. № 69. P. 377–382.
- Mulyukin A. L., Demkina E. V., Kryazhevskikh N. A., Galchenko V. F., El'-Registan G. I., Suzina N. E., Duda V. I., Vorob'eva L. I. Dormant forms of *Micrococcus luteus* and *Arthrobacter globiformis* not platable on standard media // Microbiology (Mikrobiologiya). 2009. N 78. P. 407–418.
- Kudinova A. G., Lysak L. V., Soina V. S., Mergelov N. S., Dolgikh A. V., Shorkunov I. G. Bacterial communities in the soils of cryptogamic barrens of East Antarctica (the Larsemann Hills and Thala Hills oases) // Eurasian Soil Science. 2015. Vol. 48. P. 276–287.

РОЛЬ МЕГА-ПЛАЗМИД В АДАПТАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *ACINETOBACTER*

О. А. Маслова, М. А. Петрова

Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», Москва, e-mail: elvi.23@mail.ru

Одну из серьезнейших современных проблем здравоохранения представляют штаммы бактерий, устойчивых к антибиотикам, особенно с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам разных классов. В настоящее время совершенно ясно, что как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии способны быстро адаптироваться к имеющимся лекарственным средствам и другим факторам среды с помощью механизмов горизонтального переноса генов (ГПП). Участниками ГПП являются мобильные генетические элементы (МГЭ), способные перемещаться внутри или между молекулами ДНК, такие как транспозоны и интегроны, а также те, которые способны перемещаться между бактериальными клетками, такие как плазмиды. Вместе эти элементы играют центральную роль в обеспечении горизонтального генетического обмена и, следовательно, способствуют приобретению и распространению генов устойчивости [Partridge, 2018].

Особого внимания заслуживают представители рода *Acinetobacter*, которые широко распространены в природе, а некоторые являются опасными возбудителями внутрибольничных инфекций по всему миру. Представители рода *Acinetobacter* проявляют значительную способность к колонизации различных экологических ниш и быстрой и успешной адаптации к ним в основном благодаря высокой генетической пластичности, обусловленной с приобретением и поддержанием множества плазмид в клетке [Brovedan, 2020]. Обмен плазмидами, несущими гены, кодирующие различные адаптационные признаки, например, связанные с патогенностью, приобретением новых метаболических путей, устойчивостью к тяжелым металлам и/или антибиотикам, обеспечивает эволюционные изменения, необходимые для преодоления селективного давления окружающей среды. На настоящий момент (на 13 января 2022 г.) в базе данных NCBI депонировано 3926 последовательностей плазмидацинетобактеров, из них 1872 (48 %) приходится на наиболее активно исследующийся в связи с его клинической значимостью вид *Acinetobacter baumannii*.

Мы обнаружили новую группу конъюгативных мега-плазмид и провели их структурный и функциональный анализ.

Сравнительный анализ природных и клинических вариантов мега-плазмид показал, что протяженный (размером около 200 тпн) дополнительный район плазмид содержит множество отдельных генов, а также мобильных элементов, играющих ведущую роль в адаптации хозяйской клетки к условиям среды обитания. Накопление новых адаптивных генов и утрата потерявших свою значимость происходит с большой скоростью. У природных штаммов дополнительный район содержит несколько оперонов устойчивости к различным тяжелым металлам, а у клинических эти гены частично или полностью теряются, а взамен них происходит приобретение различных генов устойчивости к антибиотикам. Большинство клинических плазмид содержат более 10 детерминант устойчивости к различным антибактериальным препаратам.

Показано, что мега-плазмиды способны не только сами передаваться при конъюгации, но и мобилизовать более мелкие плазмиды, которые в свою очередь также могут нести адаптационные гены.

Также нами было исследовано распространение конъюгативных мега-плазмид среди природных и клинических штаммов. Оказалось, что мега-плазмиды были широко распространены среди природных ацинетобактеров уже задолго до начала «антибиотической эры». В настоящее время они встречаются как в клинических, так и в природных ацинетобактерах разных видов, включая *A. baumannii*. Таким образом, мега-плазмиды играют важную роль в адаптации представителей рода *Acinetobacter* как в природе, так и в клинике.

Литература

Partridge S. R., Kwong S. M., Firth N., Jensen S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance // *Clinical Microbiology Reviews*. 2018. Vol. 31 (4). e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>

Brovedan M. A., Cameranesi M. M., Limansky A. S., Morán-Barrio J., Marchiaro P., Repizo G. D. What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 36. Art. 109. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02890-7>

АДАПТАЦИЯ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК КАК СЛОЖНОГО СИМБИОТИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА ЖИВОТНЫХ И МИКРООРГАНИЗМОВ К ИСКУССТВЕННЫМ УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ

А. А. Никонова, О. О. Майкова
И. В. Ханаев, О. Ю. Глызина

Лимнологический институт СО РАН
Иркутск, e-mail: alenaxis@list.ru

Антропогенное воздействие на природу вносит изменения в состояние экосистем. С 2011 г. в оз. Байкал обнаружена массовая гибель губок [Ханаев, 2018]. Проведение биохимических исследований может прояснить причину данного явления. Пресноводные губки представляют собой чрезвычайно сложное симбиотическое сообщество животных и микроорганизмов, что затрудняет анализ и интерпретацию результатов. Многие вопросы, связанные с механизмами функционирования и адаптации губок и микроорганизмов, входящих в состав организма-хозяина, к стресс-факторам, пока совершенно не изучены.

Известный байкаловед Глеб Юрьевич Верещагин говорил, что «Байкал есть ключ к пониманию фауны и флоры внутренних вод Евразии». Байкальские губки являются поистине уникальным объектом изучения в плане адаптационных возможностей по отношению к стремительно изменяющимся условиям окружающей среды. Байкальские губки обладают чертами исключительной древности. Они оставались без каких-либо изменений на протяжении нескольких геологических периодов. Аналогичные современным ископаемые виды губок обнаружены в Прибайкалье в отложениях третичного периода при возрасте озера Байкал 20–25 млн лет [Верещагин, 1949].

Губки чрезвычайно требовательны к высокому качеству воды. Так, известно, что минерализация воды в озере составляет всего 96–98 мг/л. Высокое содержание кислорода в поверхностной воде (13–14,6 мг/л), низкотемпературный режим в течение всего года, достаточная освещенность при высокой прозрачности байкальской воды (до 40 м по диску секи), значения рН от 7,1 до 8,1 в поверхностной воде с глубинами от 5 до 50 м, низкое содержание биогенных элементов (нитратный азот ≤ 95 мг/м³, фосфатный фосфор ≤ 10 мг/м³), повышенное содержание Si, оказывают огромное влияние на целый ряд физико-химических, биологических и биохимических процессов, протекающих в озере [Вотинцев, 1963].

На сегодняшний день представлено мало работ по длительному содержанию губок в искусственных условиях, которое может быть полезным при изучении стрессовых состояний и адаптационных реакций губок и населяющих их микроорганизмов к различным изменениям условий окружающей среды. Целью настоящего исследования явились оптимизация условий длительного содержания *in vitro* и изучение адаптационных реакций губок к условиям окружающей среды и воздействию низких концентраций ксенобиотиков.

Для исследования были взяты два вида эндемичных губок: глобульные *Baikalospongia bacillifera* и ветвистые – *Lubomirskia baicalensis*. Губки отбирали в южной котловине озера Байкал на глубинах 5–20 м и доставляли в лабораторию в пластиковых контейнерах-термосах вместимостью 20 л. Губки перемещали в аквариумы вместимостью 15 л. Освещенность составляла 2 лк на глубине 3–15 см от дна аквариума со спектром в видимой области 500–565 нм и энергией фотонов 2,19–2,48 эВ. Аквариумы предварительно заполняли глубинной (400 м) бутилированной байкальской водой, аэрировали атмосферным воздухом, либо смесью кислорода и воздуха до достижения $C(O_2)$ в воде ~12–20 мг/л. Воду в аквариумах подменяли на 1/5 каждые 48–72 ч. Температуру воды поддерживали на уровне +8 °С. Экспериментально устанавливали максимально допустимую массу губок в одном аквариуме – не более 300 г. Проводили контрольные эксперименты с ежедневным отбором проб в течение первых 10 дней, а также через 1 и 4 мес. для *L. baicalensis*; с ежедневным отбором проб в течение первых 10 дней, а также через 1, 6 и 12 мес. – для *B. bacillifera*.

Состояние губок оценивали по внешнему виду (цвет, форма, наличие оскулярных трубок), запаху, по количественному соотношению живых и мертвых амeboидных клеток губки с эукариотическими эндосимбионтами *Zoochlorella* sp. при окраске метиленовым синим. Также определяли соотношение насыщенных (НЖК), мононенасыщенных (МНЖК), полиненасыщенных (ПНЖК) демоспонгиевых (ДСЖК) жирных кислот (ЖК), холестерина и его предшественника сквалена, определенных с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) на оборудовании Agilent 6890В 7000С Triple Quad (Agilent, США). Окислительный стресс с использованием спектрофотометра Cintra-20 (GBC, Австралия) оценивали по содержанию продуктов перекисного окисления липидов (ППОЛ), а именно соединений, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой, включая малоновый диальдегид. Первичную гипоксию при несвоевременной подмене воды или перенаселении аквариума оценивали по

появлению 9-октадеценаля и снижению содержания 9-октадеценовой (олеиновой) кислоты с 22 до 11 % от общей массы ЖК.

Отмечен выраженный адаптивный потенциал байкальских губок, позволяющий содержать в искусственных условиях чистой байкальской воды *L. baicalensis* минимум до 4 мес., и *B. bacillifera* – минимум до 12 месяцев. Более длительные испытания не проводились. Показано, что для визуально здоровых особей в первые 10 дней после отбора содержание мертвых клеток с эукариотическими эндосимбионтами составляло 5–10 % и оставалось относительно постоянным в течение длительного периода до 12 мес. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью окраски метиленовым синим (МС) при использовании нецитотоксичных концентраций МС (3 мкл 20мкМ раствора на 10 мкл суспензии губочных клеток на предметном стекле).

Стоит сказать, что губки, отобранные из оз. Байкал с признаками окислительного стресса (содержание ППОЛ до 0,2 мкг/г сухой массы), восстанавливались в искусственных условиях глубинной воды до полного исчезновения ППОЛ. Наличие стресса у губок, отобранных в Байкале (ППОЛ 0,01–0,53 мкг/г), их адаптация и восстановление в искусственных условиях обитания говорят о снижении качества прибрежной воды озера Байкал, которое является недостаточным для нормального существования пресноводных байкальских губок.

Учитывая присутствие поверхностно-активных веществ АСПАВ в оз. Байкал [Nikopova, 2022] изучено влияние низких концентраций АСПАВ (смесь гомологов от С3 до С18) (10 мкг/л) на организм губок. Через 14 дней воздействия наблюдали появление ППОЛ (0,16–2,0 мкг/г сухой массы). При длительном воздействии отмечено снижение доли ненасыщенных ЖК с 70 до 50 %. Это говорит о сбое работы антиоксидантной системы губок и истощению их адаптационных ресурсов к низким концентрациям АСПАВ в искусственных условиях. Учитывая сопоставимый уровень концентраций АСПАВ в Байкале можно предполагать возникновение окислительного стресса, ослабление организма и заболевание губок в результате действия указанных веществ.

Авторы выражают огромную благодарность директору ЛИИ СО РАН д-ру геол.-минерал. наук А. П. Федотову за отбор проб байкальских губок.

Исследование выполнено в рамках гос. задания Министерства науки и высшего образования РФ № 0279-2021-0005 «Исследование трансформации водоемов и водотоков Восточной Сибири...» на базе аквариального комплекса УНУ ПАК ЛИИ СО РАН.

Литература

- Верещагин Г. Ю. Байкал. М. : Изд. географ. литер., 1949. 230 с.
- Вотинцев К. К., Глазунов И. В. Гидрохимический режим озера Байкал в районе пос. Лиственничного // Труды Лимнологического института. Т. 3 (23). Гидрохимические исследования оз. Байкал / под ред. Г. И. Галазия. М. : Изд-во АН СССР, 1963. С. 3–56.
- Khanaev I. V., Kravtsova L. S., Maikova O. O. et al. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: Sponge disease and the problem of conservation of diversity // J. Great Lakes Res. 2018. Vol. 44. P. 77–85.
- Nikonova A. A. Organic synthetic anionic surfactants as persistent organic pollutants of water ecosystems // Limnol. Freshw. Biol. 2020. Vol. 4. P. 620–621.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИОННАЯ РЕАКЦИЯ БАЙКАЛЬСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА В ОТВЕТ НА АНТРОПОГЕННУЮ НАГРУЗКУ

А. А. Никонова¹, С. М. Шишлянников^{1,2},
В. А. Оболкин¹, С. С. Воробьева¹

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, e-mail: alenaxis@list.ru

²Институт гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург

При действии внешних факторов на живую клетку и организм в целом развивается комплекс неспецифических и специфических адаптационных реакций. Неспецифические адаптационные реакции организма или стресс являются откликом системы на чрезвычайные непривычные раздражители и позволяют оценить масштаб воздействия тех или иных стрессовых факторов на организм. Адаптивный механизм в данном случае подразумевает активацию систем организма, противодействующих стресс-фактору и поддерживающих гомеостаз и динамическое равновесие организма с внешней средой [Зеличенко, 2009].

Сила воздействия химических стресс-факторов на клетку с одной стороны определяется характеристиками этих факторов (концентрация и физико-химические свойства молекул), с другой – индивидуальной реакцией субъектов экосистемы, их адаптационными возможностями и ресурсами. При длительном, повторяющемся, либо интенсивном воздействии может наступить срыв приспособительных реакций организма. Это ведет к исчерпанию ресурсов, нарушению гомеостаза, состоянию дистресса и патологическим изменениям [Зеличенко, 2009].

Микроорганизмы водных экосистем, например, представители фитопланктона, снабжены возможностью активации гормональной, адениннуклеотидной, простагландиновой и антиоксидантной систем.

Антиоксидантная система наиболее изучена и позволяет противостоять влиянию природных физико-химических факторов [Karthikeyan, 2013].

Поступление в водоемы ксенобиотиков, к воздействию которых не выработаны устойчивые адаптационные механизмы, является острой проблемой нынешнего века. Наиболее распространенными стойкими загрязнителями водных экосистем на сегодняшний день являются тяжелые металлы, полициклические ароматические углеводороды, анионные поверхностно-активные вещества [Lewis, 1991; Jorgensen, 2000] и фталаты. Общей особенностью первых трех классов веществ является их способность вызывать окислительный стресс и гипоксию на уровне клетки и организма в целом.

Индикаторами окислительного стресса как неспецифической адаптационной реакции организма выступают альдегиды, в том числе малоновый диальдегид. Их образование связано с повреждением клеточных мембран активными формами кислорода. Из ферментов-индикаторов наиболее изучены супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза. Активность данных соединений, как правило, возрастает при незначительных или начальных стрессовых состояниях. При длительном либо интенсивном воздействии стресс-фактора ферментный механизм может блокироваться, вызывая заболевание организма и его гибель.

Озеро Байкал является самым глубоким (максимальная глубина 1642 м) и самым древним (20–25 млн лет) рифтовым озером, содержащим 23 615,39 км³ ультрапресной воды с общей минерализацией 96–98 мг/л. Строение его котловины таково, что при площади поверхности 32 822 км² на долю литорали приходится всего ~3,4 %. Литораль сосредотачивает максимальное биоразнообразие видов (>98 %) с биомассой ~100–620 кг/Га на глубинах <4–70 м. Фитопланктон населяет литораль и пелагиаль озера вплоть до глубин ~750 м при его максимальной численности в фотической зоне с глубинами до ~60–120 м и в зоне максимального ветрового перемешивания с глубинами до ~200–300 м. Первичная продукция фитопланктона в весенний период достигает 160 т/Га [Вотинцев, 1975]. Фитопланктон крайне чувствителен к изменениям условий окружающей среды. От его благополучия зависит состояние всей экосистемы. Целью нашего исследования явилась оценка неспецифической адаптационной реакции фитопланктона озера Байкал в ответ на антропогенную нагрузку (АН).

Отбор фитопланктона проводили в подледный период (конец марта – начало мая) и в открытый период (конец мая – начало июня) в 2014–2021 гг. в трех котловинах озера Байкал. Пробы воды объемом 1 л фиксировали раствором Люголя, концентрировали и использо-

вали для идентификации, подсчета численности и биомассы. Проводили анализ состава жирных кислот (ЖК) планктона с использованием газового хроматографа Agilent 6890В в сочетании с масс-спектрометром 7000С Triple Quad (Agilent, США). Определение продуктов перекисного окисления липидов (ППОЛ) проводили с использованием спектрофотометра Cintra-20 (GBC, Австралия) как описано ранее [Nikonova, 2022].

Индикаторами окислительного стресса как неспецифической адаптационной реакции планктона служило снижение в пробах доли полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) и появление ППОЛ. В подледный и ранневесенний период при минимальной численности диатомовых водорослей в составе фитопланктона окислительный стресс в пелагической относительно чистой зоне и в прибрежной зоне с интенсивной АН не обнаружен.

В период массового цветения диатомовых Bacillariophyta (конец мая – начало июня) с доминированием *Synedra acus* subsp. *radians* найдены отличия пелагического и прибрежного фитопланктона. Содержание ПНЖК в пелагических пробах было до 15% выше, чем в прибрежных, отобранных вблизи населенных пунктов. Одновременно с началом массового цветения диатомовых в пробах прибрежного фитопланктона появляются ППОЛ (40–880 мкг/г сухой массы), в то время как в пелагическом ППОЛ не выявлены. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном окислительном стрессе прибрежного фитопланктона Байкала в районах с повышенной АН [Nikonova, 2022]. Стресс пелагического фитопланктона, отобранного на максимальном удалении от берега не выявлен. Стресс прибрежного планктона можно объяснить повышенными концентрациями ксенобиотиков в воде прибрежной зоны

Отмечена разная адаптационная способность микроводорослей разных отделов к воздействию активных форм кислорода. Так в состав клеточных мембран водорослей Dinophyta, Chrysophyta, Struportophyta, доминирующих в подледный период, входят целлюлоза и гемицеллюлоза, делающие мембрану более устойчивой. По этой причине окислительный стресс планктона в подледный период не обнаружен. Клеточная мембрана диатомей, массовое цветение которых начинается после вскрытия озера ото льда, состоит из двойного слоя липидов. Доля ПНЖК в мембранах *S. acus* достигает 30 %. ПНЖК наиболее подвержены воздействию активных форм кислорода. Таким образом, интенсивная и постоянная АН на прибрежную зону Байкала приводит к стрессу диатомовых водорослей, сбою работы их антиоксидантной системы, истощению адаптационных свойств и повреждению клеточных мембран.

Исследование выполнено в рамках гос. задания Министерства науки и высшего образования РФ № 0279-2021-0005 «Исследование трансформации водоемов и водотоков...».

Литература

- Вотинцев К. К., Мещерякова А. И., Поповская Г. И. Круговорот органического вещества в озере Байкал. Новосибирск : Наука, 1975. 190 с.
- Зеличенко Л. И., Порядин Г. В. Стресс и патология. Кафедра патологической физиологии / под ред. Г. В. Порядина. М. : М-во здравоохранения РФ. РГМУ, 2009. 24 с.
- Jorgensen E., Christoffersen K. Short-term effects of linear alkylbenzene sulfonate on freshwater plankton studied under field conditions // Environ. Toxicol. and Chem. 2000. Vol. 19, N 4. P. 904–911.
- Karthikeyan P., Manimaran K., Sampathkumar P., et al. In vitro Antioxidant Activity of Marine Diatoms // IOSR-JESTFT. 2013. Vol. 5, N 2. P. 32–37.
- Lewis A. M. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment // Wat. Res. 1991. Vol. 25, N 1. P. 101–113.
- Nikonova A. A., Shishlyannikov S. M., Volokitina N. A., Galachyants Yu. P., Bukin Yu. S., Blinov V. V., Gnatovsky R. Yu., Vorobyeva S. S. Fatty Acid Changes in Nearshore Phytoplankton under Anthropogenic Impact as a Biodiversity Risk Factor for the World's Deepest Lake Baikal // Diversity. 2022. Vol. 14, N 1. P. 55.

ОТЛИЧИЯ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ РУБЦА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АРЕАЛА ОБИТАНИЯ

Е. С. Пономарева¹, В. А. Филиппова²

¹ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург, e-mail: kate@biotrof.ru

²Санкт-Петербургский государственный аграрный университет
Санкт-Петербург, e-mail: filippova@biotrof.ru

Современные молекулярно-генетические методы позволяют детально оценить функциональное состояние микробного сообщества. Углубление знаний о функциональных процессах, происходящих в рубце северных оленей, позволит улучшить представления об их физиологических адаптационных особенностях и создать предпосылки для наилучшего применения кормовых добавок и диагностики состояния животного [Firkins, 2015].

Характеристику адаптационных особенностей функциональных особенностей микробиома рубца северных оленей Ненецкой породы проводили на основе данных молекулярно-генетического анализа образцов, отобранных во время экспедиций в регионы Российской Арктики в течение 2017–2021 гг. Был проведен отбор 37 образцов (Ямало-Ненецкий и Ненецкий АО), которые представляли собой содержимое рубца от клинически здоровых особей северного оленя (не менее 3-кратной повторности среди животных-аналогов).

Для анализа микробиоты рубца животных было проведено полногеномное NGS секвенирование сообщества на приборе MiSeq (Illumina, США). Таксономия сообщества рубца северного оленя Ненецкого и Ямало-Ненецкого АО на основе результатов функциональной аннотации согласно базе данных RAST представлена в табл.

Таблица

Таксономия сообщества рубца северного оленя Ненецкого и Ямало-Ненецкого АО на основе результатов функциональной аннотации

Фила	Ненецкий АО, (%)	Ямало-Ненецкий АО, (%)
<i>Firmicutes</i>	45,13	52,16
<i>Bacteroidetes</i>	39,79	34,08
<i>Proteobacteria</i>	3,36	2,98
<i>Euryarchaeota</i>	2,87	2,18
<i>Actinobacteria</i>	2,09	2,37
<i>Streptophyta</i>	–	2,18
<i>Spirochaetes</i>	0,74	0,35
<i>Fibrobacteres</i>	0,37	0,21
<i>Chloroflexi</i>	0,35	–
<i>Verrucomicrobia</i>	0,35	–
<i>Planctomycetes</i>	0,31	–
<i>Fusobacteria</i>	0,29	0,32
<i>Synergistetes</i>	0,25	0,79
<i>Cyanobacteria</i>	–	0,18
Другое	5,77	2,2

Согласно серверу MG-RAST таксономически более 96 % последовательностей относились к домену Bacteria, 2,18 % к домену Eukaryota, 1,54 % к домену Archaea и 0,14 % последовательностей относились к вирусным. Сравнение двух образцов с таксономической точки зрения выявило значительную схожесть сообщества рубца, что подтверждается анализом альфа-разнообразия. В Ненецком АО наблюдалось несколько большее разнообразие по сравнению с Ямало-Ненецким АО.

В обоих образцах среди эукариотических организмов, относящихся к царству животных, были выявлены Annelida, Aricomplexa, Arthropoda, Nematoda и пр. Среди царства растений были выявлены: представители низших растений – Chlorophyta, а также представителиклады Streptophyta.

Реконструкцию и прогнозирование функционального содержания метагенома, семейств генов, ферментов проводили при помощи программного комплекса PICRUSt2 (v.2.3.0) [Ishii, 2018]. Для анализа метаболических путей и ферментов пользовались базой данных MetaCyc (<https://metacyc.org/>).

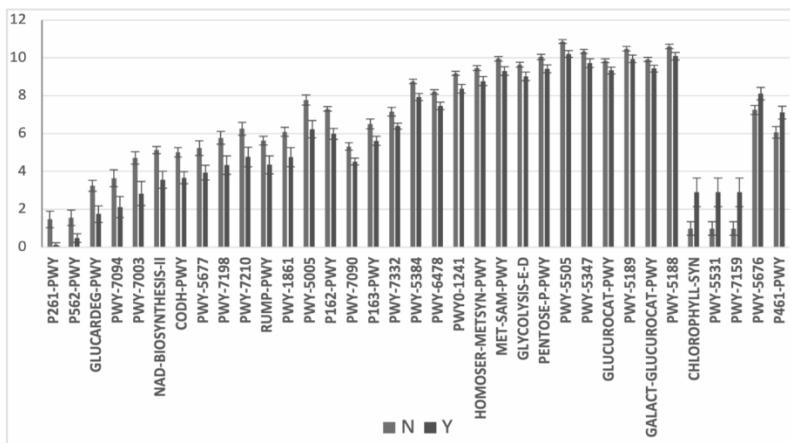


Рис. Гистограмма прогнозируемых метаболических путей, характеризующая достоверные различия ($p \leq 0,05$) между регионами (Ненецкий и Ямало-Ненецкий АО).

Обозначения: N – Ненецкий АО; Y – Ямало-Ненецкий АО

Региональные отличия функций метагеномного сообщества затрагивали такие метаболические пути, как биосинтез кофакторов и коферментов, аминокислот (метионина), нуклеиновых кислот, витаминов (биотина), обмен жирных кислот, углеводный обмен и др. Выявлено достоверное отличие ($p = 0,013$) по прогнозируемым метаболическим путям, связанным с детоксикацией высокотоксичного формальдегида, что может быть обусловлено повышением активности метанотрофных бактерий, и, соответственно, метаболизма метана в рубце. В геноме сообщества рубца оленей Ямало-Ненецкого АО наблюдалось большее, по сравнению с Ненецким АО разнообразие гликозилгидролаз. На данном уровне выявлены очевидные различия в спектре продуцируемых ферментов, отвечающих за утилизацию сложных полисахаридов. Возможно, это связано с тем, что в рубце северных оленей из Ямало-Ненецкого АО большую долю занимали представители фила *Firmicutes*, к числу которых относится наибольшее число деструкторов сложных полисахаридов [Сизова, 2018].

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 17-76-20026.

Литература

Сизова А. В. Значение микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных и использование бактерий – симбиотиков в животноводстве. М., 2018. 91 с.

Firkins J. L. Ruminant nutrition symposium: how to use data on the rumen microbiome to improve our understanding of ruminant nutrition // J. Anim Sci. 2015. N 93. P. 1450–1470.

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ АРАБИНОГАЛАКТАНА И КАРРАГИНАНА НА РОСТ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Н. А. Рубаненко¹, О. Ф. Вятчина¹, Ю. П. Джиоев², Б. Г. Сухов³,
А. С. Григорьева¹, Л. А. Степаненко², Н. А. Арефьева¹,
А. Э. Макарова², Я. А. Портная², В. И. Злобин²

¹Иркутский государственный университет
Иркутск, e-mail: olgairk3@gambler.ru

²Иркутский государственный медицинский университет
Иркутск, e-mail: alanir07@mail.ru

³Институт химической кинетики и горения
им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск

Введение. Известно, что нанополисахаридные соединения арабиногалактана и каррагинана обладают биологической активностью [Лесничая и др., 2010]. Показано, что каррагинаны имеют широкий спектр антивирусной активности при низких концентрациях и оказывают *in vitro* ингибирующее влияние на репликацию ряда ДНК- и РНК-вирусов человека и животных [Carlucci et al., 1999], а также на фитопатогенные вирусы, в частности вирус табачной мозаики [Ермак и др., 2014]. Выявлено значительное влияние различных концентраций к-каррагинана на рост *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *L. acidophilus* [Sagdic et al., 2004]. Показано, что система «гидрогель на основе к-каррагинана + *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*» обеспечивала пролонгацию ларвицидной активности биопестицидов против *Aedes aegypti* [Nasser et al., 2021]. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют данные о влиянии арабиногалактана и каррагинана на рост *B. thuringiensis*.

Цель данной работы: изучить влияние арабиногалактана и каррагинана на рост штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki*, выявить наиболее эффективные ростостимулирующие концентрации исследуемых полисахаридов.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся штамм *Bacillus thuringiensis* ssp. *krustaki* 7-14кс из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Иркутского государственного университета [Вятчина, 2004]. В качестве стимуляторов роста (СР) использовали нанополисахаридные соединения арабиногалактана (АГ) и каррагинана (КГ), синтезированные в Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения РАН.

Штамм культивировали в жидкой среде LB следующего состава (%): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl – 1,0. Концентрация нанополисахарида (АГ или КГ) в среде составляла: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} %. Контролем служила среда без добавления указанных соединений. Культивирование проводили в стационарных условиях при температуре 30 °С в течение 24 ч. Количество клеток определяли, используя метод серийных разведений с последующим высевом на плотную среду LB.

Результаты. Проведенные исследования показали, что наибольшее стимулирующее действие на рост штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki* 7-14кс оказывал нанополисахарид каррагинан в концентрации 10^{-5} %. При этом количества клеток через 24 ч культивирования было в 14,4 раза больше, чем в контроле (рис. 1).

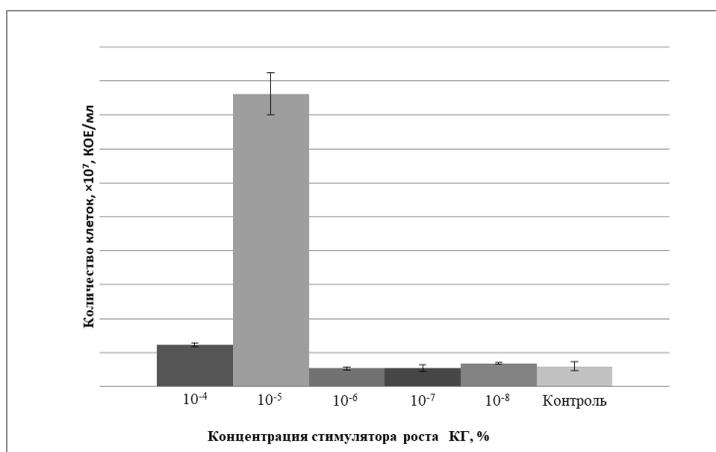


Рис. 1. Влияние каррагинана (концентрации 10^{-4} – 10^{-8} %) на рост штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki* 7-14 кс в среде LB

Арабиногалактан в концентрации 10^{-4} и 10^{-5} % приводил к повышению численности клеток *B. thuringiensis* в 2 и 4 раза по сравнению с контролем, соответственно (рис. 2).

Более низкие концентрации (10^{-6} – 10^{-8} %) полисахаридов (каррагинан и арабиногалактан) не оказывали достоверного влияния на рост *B. thuringiensis* (рис. 1, 2). Таким образом, каррагинан в концентрации 10^{-5} % является высокоэффективным стимулятором роста для исследуемого штамма *B. thuringiensis*. Полученные данные представляют интерес как один из способов интенсификации производства биопрепаратов против вредных насекомых.

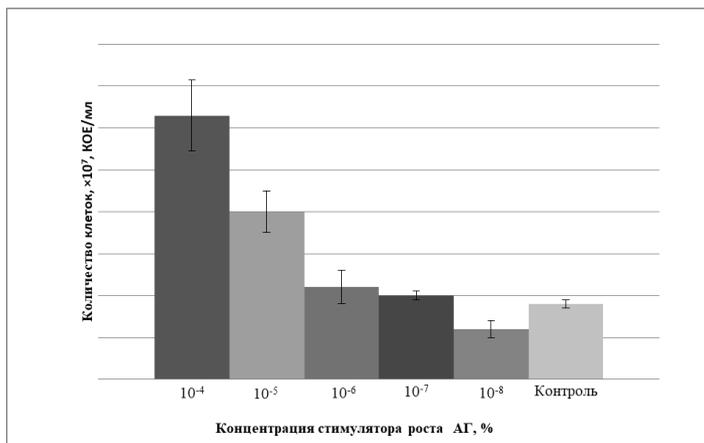


Рис. 2. Влияние арабиногалактана (концентрации 10^{-4} – 10^{-8} %) на рост штамма *B. thuringiensis* ssp. *krustaki* 7-14 кс в среде LB

Литература

Вятчина О. Ф. Штаммы *Bacillus thuringiensis*, выделенные при эпизоотии лиственничной мухи (*Hylemyia laricicola*) в Камчатской области // Сибирский экологический журнал. 2004. № 4. С. 501–506.

Ермак И. М., Бянкина (Барабанова) А. О., Соколова Е. В. Структурные особенности и биологическая активность каррагинанов – сульфатированных полисахаридов красных водорослей Дальневосточных морей России // Вестник ДВО РАН. 2014. № 1. С. 80–92.

Лесничая М. В., Александрова Г. П., Феоктистова Л. П. и др. Серебросодержащие наноконпозиаты на основе галактоманнана и каррагинана: синтез, строение, антимикробные свойства // Известия АН. Серия Химия. 2010. № 12. С. 2266–2271.

Carlucci M. J., Ciancia M., Matulewicz M. C., Cerezo A. S., Damonte E. B. Antherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types // Antivir. Res. 1999. Vol. 43. P. 93–102.

Nasser S., da Costa M. P. M., de Mello Ferreira I. L., Lima J. B. P. κ -Carrageenan-*Bacillus thuringiensis israelensis* hydrogels: A promising material to combat larvae of the *Aedes aegypti* mosquito // Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2021. Vol. 2. 100125.

Sagdic O., Şimşek B., Orhan H., Doğan M. Effect of κ -carrageenan on bacteria and some characteristics of yoghurt // Milchwissenschaft. 2004. Vol. 59(1-2). P. 45–47.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АДАПТАЦИЯ ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ К ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Д. А. Русакова^{1,2}, М. Л. Сидоренко^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет
Владивосток, e-mail: gusakova.da@dvfu.ru

²Федеральный научный центр Биоразнообразия ДВО РАН
Владивосток, e-mail: sidorenko@biosoil.ru

В последнее время большой научный интерес направлен на изучение механизмов адаптации и ферментативной активности психрофильных микроорганизмов. Известно, что психрофилы растут преимущественно при температуре от +10 до –20 °С. При этом строгие (облигатные) психрофилы неспособны размножаться при температуре выше 20 °С, а факультативные (также называемые психротрофами) имеют оптимум роста от 22 до 30 °С [Зверева, Бойченко, 2013].

В последние годы появилось много научных статей о возможности существования микроорганизмов в экстремальных условиях. Особый интерес представляют работы, связанные с изучением биохимических модификаций и физиологических изменений, происходящих в бактериальной клетке, и оценкой их метаболической активности под воздействием низких температур [Nikrad et al, 2016]. Пребывание микробиоты в экстремальных условиях (например, при пониженной температуре) способствует проявлению у нее уникальных особенностей, в частности активности специфических ферментов [Доманская и др., 2017].

Цель данного исследования рассмотреть ферментативную адаптацию психрофильных микроорганизмов к факторам внешней среды.

За период с 2020 по 2021 г. выделили 26 штаммов психротрофных микроорганизмов из различных мест обитания Приморского края. Все пробы отбиралась в зимний период времени. В данном исследовании изучены образцы почв 3 ареалов обитания микроорганизмов – пещера, горная местность и обмелевший ручей. Для определения оптимальной температуры роста выделенных штаммов, микроорганизмы высевали на питательный бульон, инкубируя их при температурах 4, 25 и 37 °С. В результате эксперимента выявили 18 штаммов, активно растущих при 25 °С, 6 штаммов при 4 °С и 2 штамма при 37 °С. Анализ на ферментативную активность психротрофных штаммов проводили при 2 температурных режимах (4 и 25 °С) на субстратах молоко, пектин, липидный гомогенизат, фосфор. Наибольшее ко-

личество штаммов показали активность при 25 °С на средах с субстратами молока, липидного гомогенизата, и наименьшее количество активностей проявили на средах с субстратами пектина, желатина, фосфор. Тогда как при 4 °С лидирующую позицию по количеству активностей занимают штаммы проявившие ферментативную деятельность на желатине. И наименьшее количество штаммов проявили активность при 4 °С на средах с субстратами фосфор и липидный гомогенизат.

Интересен тот факт, что у микроорганизмов, выделенных из почвы, отобранной на высоте 300 м ущелья Дарданеллы, психрофильные свойства присутствуют только у 4 из 15 штаммов. Из них 2 штамма активно растут при 4 °С и 2 штамма, которые имеют оптимум роста 25 °С, однако при 4 °С опережают рост инкубируемых при 37 °С. Несмотря на то что место отбора проб почвы было затенено, поскольку расположено в дубняке на северо-западном склоне, где солнечная активность в течении дня мала, психрофильные свойства выделенных штаммов развиты слабо. Возможно, незначительное количество психротрофных микроорганизмов в этом месте связано с широким диапазоном температуры за годовой период, так как средняя температура самого теплого месяца (август) составляет 20–22 °С. Порой бывает повышение до 37 °С. В январе (самый холодный месяц) температура держится в пределах –11–13 °С. Не исключены понижения до –20...– 25 °С.

Для выживания микроорганизмам в широком диапазоне температур им приходится приспосабливаться за счет различных механизмов адаптации. Так, например, штамм УД-19.2 проявил протеолитическую активность при 25 °С а при 4 °С не обладает таким свойством, однако проявляет пектиназную активность при 4 °С. Возможно, на время летнего периода этот микроорганизм активно участвует в разложении листовного покрова, а в зимний период переходит на потребление более простых веществ, для экономии энергии.

В образцах почвы Медвежьей горы (Ливадийский хребет), отобранных на высоте 1000 м, выделены 3 штамма. В результате определения оптимальной температуры роста этих микроорганизмов, установили, что 2 из них наиболее активно растут при 4 °С и 1 при 25 °С. При этом штаммы, растущие при 4 °С, показали рост при 25 °С, а штамм, имеющий оптимум при 25 °С, показал рост при 4 °С. Таким образом, данные штаммы отнесены к психротрофам. Малое количество выделенных нами штаммов психротрофных микроорганизмов в данной местности, возможно, объясняется особенностями климата и совокупности биогеоценоза. В области Ливадийского хребта климат

преобладает муссонный. В месте отбора проб лес состоит из темнохвойных деревьев (*Picea, Cedrus*). Годовая температура воздуха данной местности в пределах от $-20,2^{\circ}\text{C}$ до $15,4^{\circ}\text{C}$. Все выделенные штаммы обладают фосфатмобилизирующей, протеолитической, липолитической, пектиназной активностью. Можно предположить, что эти бактерии выработали ряд ферментативных адаптаций для защиты от фитонцидов (биологически активные вещества, образуемые хвойными лесами).

Микроорганизмы, выделенные из почвы, отобранной в пещере Николаевская (г. Дальнегорск) согласно результатам эксперимента также отнесли к психротрофам, так как 4 штамма обладали оптимумом роста при 25°C и 1 штамм – при 4°C , а при 37°C рост практически отсутствовал. Все 5 штаммов обладают протеолитической активностью при 25°C . Однако при 4°C продолжают проявлять протеолитическую активность только 2 штаммы. Таким образом эти 2 штаммы постоянны в предпочтениях питания. 2 других штамма при 4°C меняют источник питания на полисахарид (пектин), и 1 штамм на фосфат. Вероятно, эти штаммы переходят в режим накопления питательных веществ.

Из почвы обмелевшего ручья Николаевского выделили 3 штамма. В ходе работы эти микроорганизмы отнесли к психротрофам. Так как температурный оптимум роста для этих штаммов составляет 25°C , однако при 4°C опережают рост инкубируемых при 37°C . Место отбора почвы находилось в 50 м от пещеры Николаевской. Все выделенные штаммы обладали хорошей ферментативной активностью ко всем субстратам при температуре 4 и 25°C , однако активность при 4°C незначительно ниже. Вероятно, на ферментативную активность этих штаммов влияет наличие водных масс в почве, так как вода выступает переносчиком и растворителем питательных веществ.

Таким образом, рассмотрев 3 ареала обитания микроорганизмов в зимний период времени, выделили 15 психротрофных штаммов. Ферментативная активность этих штаммов различна, следовательно, виды адаптационных механизмов зависят от штаммовых свойств микроорганизма, их чувствительности к перепадам температур внешней среды и продолжительности их воздействия.

Литература

Доманская О. В., Мельников В. П., Огурцова Л. В., Соромотин А. В., Доманский В. О., Полякова Н. В. Некоторые особенности ферментативной активности различных штаммов рода *Bacillus*, выделенных из мерзлых отложений // Криосфера Земли. 2017. Т. 21. С. 63–71.

Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Т. 2 / под ред.: В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016.

Nikrad M. P., Kerkhof L. J., Haggblom M. M. The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils // FEMS Microbiol. Ecology. 2016. Vol. 92. P. 16.

ДЕЙСТВИЕ «РАННИХ» БЕЛКОВ E2, E6 И E7 ПАПИЛЛОМАВИРУСА ВЫСОКОКАНЦЕРОГЕННОГО ТИПА ВПЧ16 НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ HeLa

Р. К. Салаяев, Н. И. Рекославская

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Геном папилломавируса человека (ВПЧ) содержит «ранние» гены E2, E6 и E7 (ответственные за репликацию, интеграцию, опухолеобразование), и «поздние» гены, кодирующие белки оболочки. При этом «ранние» белки E6 и E7, кодируемые онкогенами E6/E7, являются онкобелками, а «ранний» белок E2 имеет сайты связывания в промоторной части онкогенов E6/E7 и проявляет свойства сильного онкосупрессора, блокируя транскрипцию онкогенов. Наиболее высококанцерогенным типом является ВПЧ16, на долю которого приходится 60 % раковых заболеваний. Раковые клетки HeLa содержат 6 генов ВПЧ18, второго высококанцерогенного типа (10 % заболеваний). Поэтому представлялось интересным изучить взаимодействие «ранних» белков папилломавируса на функциональную активность клеток HeLa. Синтез «ранних» белков E2, E6 и E7 производили с помощью ранее разработанной авторами растительной экспрессионной системы на основе плодов томата [Salyaev et al., 2019]. Клетки HeLa выращивали согласно прописи производителя (БИОПОЛ, Россия). На рис. 1 представлены экспериментальные результаты изучения действия «ранних» белков на клетки HeLa.

Как можно видеть из рис. 1, нативные клетки HeLa были бесцветными и в норме формировали монослой, выявляя адгезию к поверхности дна культурального флакона (1). Интенсивное окрашивание нитротетразолием синим свидетельствовало о высокой функциональной активности и эффективной жизнедеятельности, так как в монослое клетки HeLa делились и образовывали тетрады (2). Трипановый синий используют обычно для индикации мертвых клеток с поврежденными мембранами. Отсутствие окрашивания при внесении трипанового синего служит индикацией живых клеток в монослое (3).

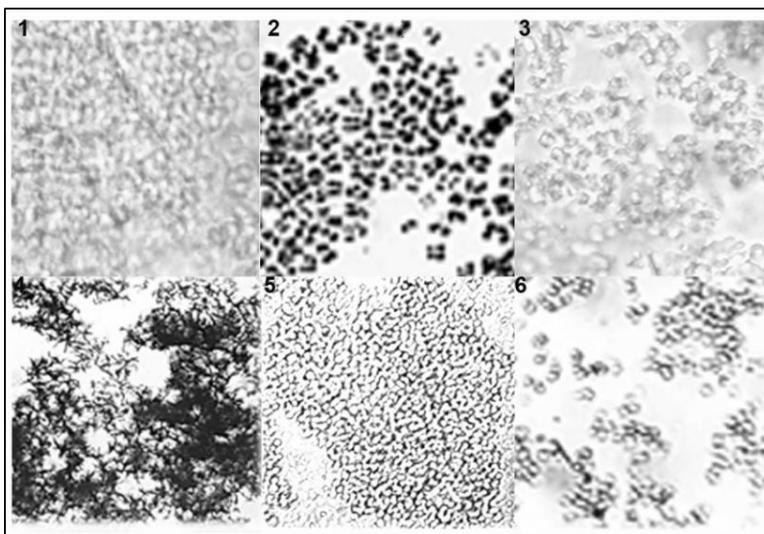


Рис. 1. Действие «ранних» белков ВПЧ16 E2, E6 и E7 на раковые клетки HeLa. 1-Монослой клеток HeLa без обработок, 2- монослой клеток HeLa после окрашивания нитротетразолием синим, 3-клетки HeLa после обработки трипановым синим, 4-клетки HeLa после внесения E2 и трипанового синего, 5-клетки HeLa после внесения E6 и трипанового синего, 6-клетки HeLa после внесения E7 и трипанового синего. Увеличение в световом микроскопе x400, видеокамера LevenGuk, программа ToupView86

При этом адгезия была ослаблена и клетки не закреплялись на дне флакона. При добавлении ВПЧ16 E2 в монослой происходила быстрая деградация клеток HeLa и прокрашивание их трипановым синим было интенсивным (4). «Ранний» белок ВПЧ16 E6 не приводил к гибели клеток HeLa, хотя, судя по изменениям в адгезии, происходили нарушения в функциональной активности клеток (5). «Ранний» белок ВПЧ16 E7 существенно нарушал адгезию клеток HeLa, так как клетки плавали в виде суспензии во флаконе, но при этом оставались живыми и бесцветными, так как не было окрашивания трипановым синим (6). Согласно полученным данным можно полагать, что супрессор онкогенов ВПЧ16 E2 вызвал гибель раковых клеток HeLa. Для проверки этих результатов мышам вводили суспензию раковых клеток HeLa (100 мкл) в бедренную мышцу и через 3 мес. мышей вакцинировали вакцинным материалом плодов томата, трансгенного по гену ВПЧ16 E2 из расчета 500 мкг E2 на мышь. Половину мышей, инфицированных клетками HeLa, оставляли невакцинированными. Че-

рез 3 мес. после этого у мышей изучали изменения во внутренних органах, в основном уделяя внимание изменениям в легких мышей. Было обнаружено, что после инфицирования клетками HeLa в легких у мышей появились различные новообразования, соответствующие охарактеризованным формам рака легких: округлые периферические опухоли, пневмонииеподобные по лопалям долей легких, периферический рак Пенкоста по краям долей, бронхиальный узловой рак и в области карины (зоны входа трахеи в легкие) и др. Масса легких вследствие этих разрастаний увеличилась в 1,5–1,8 раза у мышей, инфицированных раковыми клетками HeLa. На рис. 2 представлены гистологические исследования строения легких у мышей, инфицированных клетками HeLa, выявившие зоны с усиленным клеточным делением.

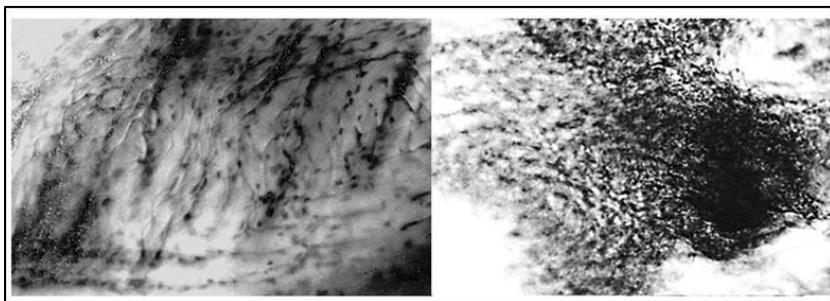


Рис. 2. Гистологическое изучение тканей легких мышей, инфицированных суспензией клеток HeLa, с нормальным ростом (слева) и опухолевой морфологией (справа). Срезы изготовлены на санном микротоме и после стандартных процедур окрашены гематоксилином по Карацци

У мышей, инфицированных клетками HeLa и впоследствии вакцинированных вакцинным материалом плодов томата с геном ВПЧ16 E2, обнаружили нормальное развитие легких без увеличения их массы и без разрастаний.

Литература

Salayev R. K., Rekoslavskaya N. I., Stolbikov A. S. The new plant expression system for the creation of vaccines against papillomaviruses // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2019. Vol. 484. P. 52–54.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУР МОРСКИХ ПЛАНКТОННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ К НЕГАТИВНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

А. А. Сысоев, И. В. Сысоева, О. Н. Данилова

ФИЦ ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН
Севастополь, e-mail: alexsyssoev@yandex.ru

Изучение механизмов адаптаций микроводорослей различной таксономической принадлежности к поллютантам является одной из наиболее актуальных тем исследований формирования биоты водных экосистем в условиях токсикологического пресса. При оценке экологических последствий антропогенного загрязнения водных экосистем концепция использования биомаркеров в качестве индикаторов токсикологического пресса поллютантов занимает центральное место. Она необходима при выборе из множества откликов гидробионтов наиболее информативных и пригодных для целей биологического мониторинга [Капков, 2003].

Цель исследования – изучение информативных откликов культивируемых микроводорослей на воздействие наиболее распространенных поллютантов. В рамках данного исследования были использованы следующие культуры микроводорослей: *Prorocentrum micans* (крупная Dinophyceae) и *Platymonas viridis* (мелкая Chlorophyta).

Выбраны параметры экспериментального анализа изменений состояния испытываемых культур: репродуктивная активность (динамика численности клеток), размеры клеток и оценка физиологического состояния организмов по внутриклеточному содержанию адениновых нуклеотидов и расчету аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) по D. Atkinson. АЭЗ вычисляются из соотношений АТФ, АДФ и АМФ. Его цифровое выражение может укладываться в диапазон от 0 до 1, однако нормальному физиологическому гомеостазу соответствует значение от 0,75 и выше [Atkinson, 1968].

Анализ численности и размеров клеток проводили на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), анализы содержания внутриклеточных адениновых нуклеотидов – по хемилуминесцентной методике на приборе АТР-Luminometr – 1250 Швеция.

В качестве поллютантов были выбраны ионы свинца [Шитиков, 2003] и различные концентрации хлорорганических пестицидов. Исходя из того, что пороговые концентрации ионов свинца составляют 100 мкг/л [Капков, 2003], для эксперимента использовали конечные концентрации ионов свинца 100 и 200 мкг/л. Все культуры выставляли на трехдневную экспозицию. Хлорорганические пестициды

(ХОП) в конечных концентрациях 0,025 мкг/мл (вариант А) и 0,150 мкг/мл (вариант В) были выставлены на 6-дневную экспозицию.

Исследуемые культуры выставляли на экспозицию с естественным освещением для роста численности на стерилизованной морской воде с добавлением питательной среды F/2. Затем аликвотные выборки объемом 250 мл распределяли в конические колбы и добавляли в них испытываемые агенты, согласно плану эксперимента.

В процессе экспозиции культур произошли следующие изменения. У крупного вида *Prorocentrum micans* отмечена большая зависимость репродуктивной активности от содержания хлорорганических пестицидов: в то время, как в контроле численность клеток, практически, удвоилась, в варианте А заметно снизилась, а в варианте В к концу экспозиции была близка к единичным значениям. У мелкой зеленой водоросли *Platymonas viridis* влияние ХОП на снижение численности отразилось только в варианте В, в умеренной степени. У крупного вида влияние ХОП обозначилось в укрупнении клеток, соответственно концентрациям поллютантов, в то время как в контроле наблюдалось постепенное снижение средних размеров клеток, вероятно связанное с усиленным клеточным делением. У *Platymonas viridis* влияние ХОП на размеры клеток было незначительным, прослеживалось постепенное снижение средних размеров.

Динамика аденилатного энергетического заряда, отражающего физиологическое состояние клеток, показала, что наибольшему негативному влиянию ХОП подвергся крупный вид исследуемых культур *Prorocentrum micans*.

При воздействии свинца на исследуемую культуру *Prorocentrum micans* наблюдалось снижение размеров клеток к концу экспозиции. Заметно прослеживаются две стадии адаптации к негативному влиянию токсиканта: в течение первых суток размеры клеток сильно возрастают, что означает снижение частоты деления клеток и внутриклеточное накопление веществ. На вторые и, особенно, на третьи сутки происходят обратные процессы: снижение размеров клеток и возрастание репродуктивной активности при снижении аденилатного энергетического заряда. В этом случае клетки в аспекте энергетических трат получают, по крайней мере, две выигрышные позиции: увеличение обмена со средой за счет увеличения удельной поверхности, что дает им преимущество в потреблении биогенов и активизации метаболических процессов, с одной стороны, и уменьшение внутриклеточных энергетических трат – с другой. В этом механизме проявляется стратегия активной адаптации организмов к негативным факторам среды [Хочачка, 1977]. Культура *Platymonas viridis* проявила наибольшую толерантность к негативному влиянию ионов свинца в этом эксперименте.

Литература

- Капков В. И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2003. 90 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимических адаптаций. М. : Мир, 1977. 398 с.
- Шитиков В. К., Розенберг Г. С., Зинченко Т. Д. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации. Тольятти : ИЭВБ РАН, 2003. 463 с.
- Atkinson D. E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers // *Biochemistry*. 1968. Vol. 7, N 11. P. 4030–4034.

РОЛЬ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ В АДАПТАЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ-ЭКСТРЕМОФИЛОВ

В. М. Терёшина¹, Е. А. Януцевич¹, О. А. Данилова¹,
С. А. Бондаренко^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии
им. С. Н. Виноградского РАН, Москва, e-mail: v.m.tereshina@inbox.ru

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва,
e-mail: bond.sonia@gmail.com

Грибы-экстремофилы эволюционно адаптированы, как правило, к одному экстремальному фактору. Однако в природных условиях они могут дополнительно подвергаться действию разнообразных стрессорных факторов, поэтому исследование механизмов их адаптации может дать представление не только об особенностях приспособления к действующему экстремальному фактору, но и понять, устойчивы или чувствительны эти грибы к действию других стрессоров.

Поддержание функционального состояния мембран при стрессе является ключевым звеном защитной системы и обеспечивается не только путем изменения их состава и структуры, но и стабилизирующим действием осмолита трегалозы [Vigh et al., 2005; Glatz et al., 2016; Yancey, 2005]. Обнаружено, что в условиях теплового шока (ТШ) у трегалозодефицитного штамма дрожжей происходят более масштабные перестройки состава мембранных липидов [Péter et al., 2021], чем у дикого штамма, синтезирующего трегалозу. Поэтому целесообразно исследование состава мембранных липидов и осмолитов одновременно.

Целью работы было исследование состава мембранных липидов и осмолитов у двух экстремофилов – термофильного гриба *Rhizomucormiehei* и алкалофила *Sodiomycestronii* в условиях действия различных стрессорных факторов.

Выращивание термофильного гриба *R. miehei* в глубинной культуре проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды Гудвина на электромагнитной качалке КЭ-12-250Т со скоростью вращения 150 об/мин при оптимальной температуре 42–43 °С в течение 24 ч.

Для изучения влияния ТШ культуру переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 52–53 °С на 1 и 3 ч, а контрольные варианты продолжали выращивать в оптимальных условиях такое же время. Холодовой шок создавали при 20 °С в течение 3 и 6 ч, а осмотический – путем введения в среду 0,125, 0,25 and 0,5 М NaCl и дальнейшего культивирования в течение 3 и 6 ч.

Алкалофильный гриб *S. tronii* выращивали на щелочном суслевом агаре pH 9,2 в поверхностной культуре. Кусочек мицелия 7-дневной посевной культуры без среды размером 1×1 мм помещали в центр чашки со средой, покрытой целлофановым диском, и инкубировали в оптимальных условиях (32 °С) в течение 7 сут. (трофофаза). Для создания холодового шока чашки Петри переносили в условия 5 °С и инкубировали в течение 3 и 6 ч, для создания теплового шока – выдерживали при 45–46°С такое же время. Для создания осмотического шока культуры на целлофановой подложке переносили на чашки Петри с новой средой, содержащей 0,5, 0,75 и 1,0 М NaCl, и инкубировали в течение 6 ч. Контрольные варианты выращивали такое же время при оптимальных условиях.

Углеводы и полиолы цитозоля после экстракции и очистки анализировали методом ГЖХ триметилсилильных производных с внутренним стандартом. Липиды экстрагировали методом Николса, разделяли методом одномерной и двумерной тонкослойной хроматографии. Количественный анализ липидов проводили с помощью денситометрии с использованием программы DENS.

Ранее нами было показано, что трегалоза и фосфатидные кислоты (ФК) имеют важное значение для термофилии. В отличие от мезофилов, у которых рост уровня трегалозы и доли ФК наблюдался только в условиях ТШ, у термофилов доминирование трегалозы и ФК было выявлено в оптимальных условиях роста. В настоящем исследовании были изучены изменения в составе мембранных липидов и углеводов цитозоля у термофильного гриба *R. miehei* под действием холодового (ХШ), теплового и осмотического (ОШ) шоков. В ответ на действие ХШ не обнаружено накопления глицерина в мицелии, количество трегалозы снижалось, а в составе мембранных липидов основные изменения касались роста доли ФК на фоне снижения стериннов. При ТШ, как и при ХШ, наблюдалось снижение уровня трегалозы, но в составе липидов повышалась доля ФК и стериннов на фоне снижения фосфатидилхолинов. При ОШ, несмотря на низкую способность мукоровых грибов синтезировать полиолы, повышалось количество полиоловглицерина и арабита, уровень трегалозы не снижался, а в со-

ставе мембранных липидов заметных изменений не обнаружено. Результаты показывают, что снижение уровня трегалозы при ТШ и ХШ сопровождалось заметной перестройкой состава мембранных липидов, чего не наблюдалось при ОШ, где такого снижения не происходит.

Ранее нами впервые было показано, что, алкалофильные грибы, как и термофилы, используют для адаптации к фактору pH трегалозную защиту. В данной работе мы пытались понять, достаточно ли большого количества трегалозы в мицелии алкалофила *S. tronii* для защиты от других стрессорных воздействий –ХШ, ТШ и ОШ. При адаптации к ХШ у гриба наблюдалось только повышение степени ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов на фоне постоянства состава мембранных липидов и осмолитов. В условиях ТШ наблюдалось двукратное повышение уровня трегалозы и небольшое увеличение доли фосфатидилэтаноламинов на фоне снижения фосфатидных кислот. При ОШ количество трегалозы не снижалось, а возрастал уровень полиоловарабита и маннита, на фоне постоянства относительного содержания мембранных липидов. Результаты показывают, что у алкалофила количество трегалозы не снижалось при воздействии всех стрессоров и наблюдалось относительное постоянство состава мембранных липидов.

В совокупности результаты показывают большую приспособленность *S. tronii* к действию разнообразных стрессоров, что можно рассматривать как полиэкстремофилию. Напротив, термофил *R. miehei*, из-за снижения уровня трегалозы, значительно менее устойчив к действию изученных стрессоров. В итоге полученные результаты на примере двух различных экстремофильных грибов показывают взаимосвязь между уровнем трегалозы в мицелии и глубиной перестройки состава мембранных липидов.

Литература

- Glatz A., Pilbat A., Németh G. L., Vince-kontár K Involvement of small heat shock proteins, trehalose , and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe* // Cell Stress & Chaperones. 2016. Vol. 21. P. 327–338.
- Péter M., Gudmann P., Kóta Z., Török Z., Víg L., Glatz A., Balogh G. Lipids and Trehalose Actively Cooperate in Heat Stress Management of *Schizosaccharomyces pombe* // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. Art. 13272. <https://doi.org/3390/ijms222413272>
- Víg L., Escribá P. V., Sonnleitner A. et al. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function // Progress in Lipid Research. 2005. Vol. 44. P. 303–344.
- Yancey P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // Journal of Experimental Biology. 2005. Vol. 208. P. 2819–2830.

АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ- НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ К ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Д. М. Успанова¹, Ю. И. Мурзина², А. С. Коробейникова²,
Е. В. Глинская², О. В. Нечаева¹

¹Саратовский государственный университет технический университет
им. Ю. А. Гагарина, Саратов, e-mail: dinarka_-14@mail.ru

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, e-mail: yuliya.murzina.2000@mail.ru

Для большинства гетеротрофных бактерий оптимальными условиями для роста и размножения являются температура 28 °С, значения рН, близкие к нейтральным (6,7–7,4), и содержание NaCl в среде. Однако в условиях окружающей среды эти показатели могут значительно отличаться от оптимальных, особенно в условиях высоких широт, где, в основном, ведется нефтедобыча, и имеют место техногенные аварии [Иванова и др., 2012; Пырченкова и др., 2006].

Исследования проводили с гетеротрофными бактериями, выделенными из почвы подтипа чернозем южный, которая в лабораторных условиях была загрязнена нефтью. Также использовали музейный штамм *B. pumillus* КМ из коллекции кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н. Г. Чернышевского, для которого ранее проведенные исследования позволили установить углеводородокисляющую активность [Глинская и др., 2021; Успанова и др., 2020]. Для выявления устойчивости исследуемых бактерий к низким температурам посевы культивировали при 4°С. Солетолерантность определяли на МПБ с концентрацией NaCl 7, 10 и 15 %, кислото- и щелочестойчивость – на МПА с разными значениями рН. Было установлено, что к росту при температуре 4°С среди выделенных гетеротрофных бактерий были способны только представители рода *Bacillus*, а также музейный штамм *B. pumillus* КМ (табл. 1). Способность к росту при значении рН среды 5 проявили 3 штамма, а при рН 9 – 9 штаммов. Все выделенные гетеротрофы росли в МПБ с 7 % NaCl, однако повышение концентрации NaCl до 10 % ингибировало рост двух видов бактерий, а также бактерий *M. luteus* и *S. plymuthica*. Только музейный штамм *B. pumillus* КМ проявил способность к росту при 15 % NaCl.

Таким образом, среди исследуемых штаммов наибольшую устойчивость к негативному действию физико-химических факторов проявил музейный штамм *B. pumillus* КМ. Вероятно, это связано с тем, что он является аборигенным штаммом, выделенным из почв, которые

в течение длительного времени подвергались нефтяному загрязнению, что способствовало формированию у него соответствующих адаптационных механизмов.

Таблица 1

Показатели выживаемости гетеротрофных бактерий при действии негативных физико-химических факторов

№ п/п	Исследуемый штамм	Рост при +4 °С	Рост при pH 5	Рост при pH 9	Рост в МПБ с NaCl		
	<i>B</i>		–				–
	<i>B. coagulans</i>	–				–	–
	<i>B. halmapalus</i>	–	–	–	+	+	–
4	<i>B. megaterium</i>	+	–	+	+	+	–
5	<i>B. mojavensis</i>	–	–	+	+	+	–
6	<i>B. niacini</i>	–	–	–	+	–	–
7	<i>B. pumilus</i>	+	–	+	+	+	–
8	<i>B. simplex</i>		–				–
	<i>M</i>	–				–	–
	<i>S</i>	–	–			–	–
	<i>B. pumilus</i> KM						

Также был изучен диапазон выживаемости исследуемых штаммов бактерий при действии различных концентраций нефти, внесенной в МПА. Было установлено, что *B. halmapalus*, *B. mojavensis*, *B. coagulans*, *B. niacini*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *M. luteus*, *S. plymuthica*, *B. pumilus* KM росли на МПА, содержащем 5- и 10%-ную концентрацию нефти, причем при концентрации 5 % видимый рост появлялся уже через сутки, а при концентрации 10 % – к концу первой недели культивирования (табл. 2). При действии 15%-ной концентрации поллютанта видимый рост наблюдался только на 10-е сут. культивирования и был характерен для бактерий *B. coagulans*, *B. niacini*, *B. megaterium*, *M. luteus* и *B. pumilus* KM.

Таблица 2

Способность выделенных гетеротрофных бактерий к размножению на МПА с различным содержанием нефти

Исследуемые штаммы бактерий	Концентрация нефти в среде, %		
<i>Bacillus circulans</i>	–	–	–
<i>B. coagulans</i>			
<i>B. halmapalus</i>	+	+	–
<i>B. megaterium</i>	+	+	+
<i>B. mojavensis</i>	+	+	–
<i>B. niacini</i>	+	+	+

Исследуемые штаммы бактерий	Концентрация нефти в среде, %		
<i>B. pumilus</i>	+	+	–
<i>B. simplex</i>	–	–	–
<i>Micrococcus luteus</i>			
<i>Serratiaplymuthica</i>			–
<i>B. pumilus</i> КМ			

–видимый рост, «–» – отсутствие видимого роста

Таким образом, наиболее адаптированным к физико-химическим факторам внешней среды оказался штамм *B. pumilus* КМ, который был способен к росту при низкой температуре, в широком диапазоне рН, при различной степени засоления среды, а также при высоких концентрациях нефти. Штамм *B. pumilus* КМ является аборигенным, выделенным из почв, которые в течение длительного времени подвергались нефтяному загрязнению, что, вероятно, способствовало формированию у него соответствующих адаптационных механизмов.

Литература

- Глинская Е. В., Дементьева Н. А., Петерсон А. М., Нечаева О. В., Успанова Д. М. Оценка токсического действия нефти на почвенные микроорганизмы // 3-й Российский микробиологический конгресс. г. Псков, 26 сент. – 1 окт. 2021 г. Псков : Конкорд, 2021. С. 163.
- Иванова Т. И., Кузьмина Н. П., Исаев А. П. Микробиологическая характеристика мерзлотных почв острова Тит-Ары (Якутия) // Сибирский экологический журнал. 2012. № 6. С. 831–840.
- Пырченкова И. А., Гафаров А. Б., Пунтус И. Ф., Филонов А. Е., Воронин А. М. Выбор и характеристика активных психотрофных микроорганизмов-деструкторов нефти // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. С. 298–305.
- Успанова Д. М., Нечаева О. В., Шуршалова Н. Ф., Каменева В. В., Бычков А. Р. Изучение эффективности использования сапрофитного штамма бактерий *Bacillus pumilus* для утилизации ксенобиотиков I–II класса опасности // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2020. Вып. 2, Т. 20. С. 200–206.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РОСТ, СПОРОГЕНЕЗ, ЛИПИДНЫЙ И ОСМОЛИТНЫЙ ПРОФИЛИ МЕЛАНИЗИРОВАННОГО ГРИБА *ALTERNARIA ALTERNATA*

Е. В. Федосеева¹, О. А. Данилова², Е. А. Янущевич²
В. М. Терешина², В. А. Терехова^{1,3}

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
Москва, e-mail: elenfedoseeva@gmail.com

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, e-mail: v.m.tereshina@inbox.ru

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, e-mail: vtterekhova@gmail.com

Присутствие тяжелых металлов (ТМ) в окружающей среде формирует у микроорганизмов физиологические и морфологические адаптационные стратегии [Oladipo et al., 2018], что в итоге приводит к структурным и функциональным изменениям в микробных сообществах [Terekhova et al., 2021]. Использование протекторных осмолитов и регулирование липидного профиля, а также степени насыщенности мембранных липидов (МЛ) может быть важным адаптационным механизмом грибов в ответ на токсичность загрязняющих веществ [Федосеева и др., 2021]. Важным фактором, обеспечивающим устойчивость пигментированных грибов к неблагоприятным воздействиям, считается также наличие меланинов [Pombeiro-Sponchiado et al., 2017]. Целью работы был комплексный анализ культурально-морфологических характеристик меланизированного гриба *Alternaria alternata* и биохимических изменений в составе осмолитов и липидов под влиянием солей ТМ.

Лабораторный штамм микромицета *A. alternata* культивировали на питательной среде Чапека. Соли ТМ (раздельно сульфат меди и нитрат свинца) вносили в среду одновременно с посевом. Методом кратных разведений создавали градиент концентраций от 1 г/л до 0,001 г/л в пересчете на ионы Cu и Pb. Исследовали ростовые характеристики (*funga lend points*): накопление биомассы мицелия, скорость роста колоний в поверхностной культуре и продукцию конидий. Метод экстракции липидов, ингибирующей фосфолипазы, был использован для анализа липидного состава клеток грибов. Количественный анализ липидов мембран проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии и денситометрии. Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) был использован для изучения состава жирных кислот (ЖК) во фракции полярных липидов. Осмолиты определяли методом ГЖХ триметилсилильных производных сахаров с

внутренним стандартом после экстракции и очистки. Состав липидов и растворимых углеводов цитозоля измеряли при внесении меди в концентрации ЕС30.

В присутствии в среде, как меди, так и свинца, происходило ингибирование накопления грибной биомассы. Соль меди оказывала более выраженный токсический эффект на прирост биомассы *A. alternata*: на 7-й день роста ЕС50 свинца – 0,148 г/л; ЕС50 меди – 0,046 г/л. В присутствии в среде солей обоих ТМ происходило сокращение диаметра грибных колоний. Соль меди также оказывала более выраженный токсический эффект на рост колоний *A. alternata*: на 7-й день роста ЕС50 свинца – 0,2397 г/л, ЕС50 меди – 0,0054 г/л. Продукция спор зависела от концентраций ТМ: полное ингибирование спорообразования наблюдалось при максимальной из испытанных концентраций (1 г/л), в то время как при относительно невысоких (0,2–0,01 г/л) наблюдалось его стимулирование.

Отличительной чертой МЛ *A. alternata* является высокое содержание (абсолютное и относительное) фосфатидных кислот (ФК) [Fedoseeva et al., 2021]. В целом под действием меди проявлялись следующие паттерны изменений в составе МЛ: увеличение долей фосфатидилхолинов (ФХ) и стерина (СТ) на фоне снижения доли ФК (рис., а). В составе запасных липидов при действии меди проявлялись следующие паттерны: увеличение абсолютного и относительного содержания диацилглицеридов и свободных ЖК. Под воздействием меди происходило снижение доли С18:3n3 и увеличение доли С18:1n9c в составе жирных кислот МЛ *A. alternata* по сравнению с контролем.

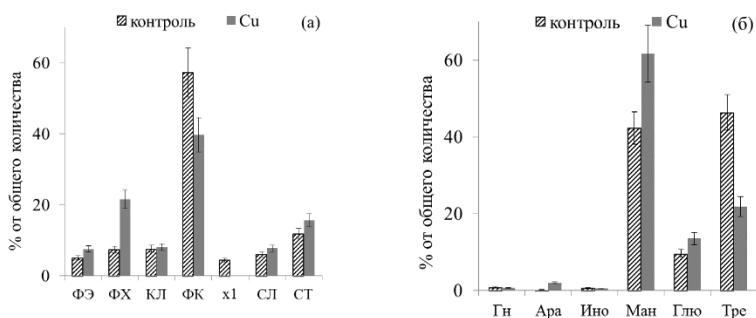


Рис. Состав мембранных липидов (а) и осмолитов (б) *A. alternata* в контроле и под действием меди (относительное содержание). Обозначения даны в тексте

Отличительной чертой *A. alternata* являлось высокое содержание (абсолютное и относительное) маннита (Ман) и трегалозы (Тре). При действии меди абсолютное содержание осмолитов не изменялось относительно контроля (9,32 и 9,35 % от веса сухой массы соответственно). При этом проявлялись следующие паттерны в составе осмолитов: увеличение долиманнита на фоне снижения доли трегалозы (рис., б).

Таким образом, фитопатогенный меланин-продуцирующий грибок *A. alternata* реагирует на внесение солей ТМ изменениями культурально-морфологических и ростовых характеристик, а также модификациями состава липидов и осмолитов, что подтверждает их важную роль в формировании устойчивости грибов к экстремальным условиям [Федосеева и др., 2021].

Благодарности. За предоставление штамма *A. alternata* благодарим канд. биол. наук А. Е. Иванову, в.н.с. кафедры биологии почв Факультета почвоведения МГУ. Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 22-24-00799 «Устойчивость и механизмы биохимических адаптаций почвенных грибов, обладающих фитопатогенной и антагонистической активностью, в условиях химического загрязнения».

Литература.

- Fedoseeva E. V., Tereshina V. M., Danilova O. A., Ianutsevich E. A., Yakimenko O. S., Terekhova V. A. Effect of humic acid on the composition of osmolytes and lipids in a melanin-containing phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* // Environmental Research. 2021. Vol. 193. P. 1–18
- Oladipo O. G., Awotoye O. O., Olayinka A., Bezuidenhout C. C., Maboeta M. S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites // Brazilian journal of microbiology. 2018. Vol. 49. P. 29–37
- Pombeiro-Sponchiado S. R., Sousa G. S., Andrade J. C., Lisboa H. F., Gonçalves R. C. Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications // Melanin. 2017. March. P. 47–75.
- Terekhova V. A., Fedoseeva E. V., BelfegJu V., Kiryushina A. P., Rychagova A. G., Verkhovtseva N. V. Structure of microbial complexes in modelling of polymetallic pollution and remediation of agrosoddy-podzolic soils // Moscow University Soil Science Bulletin. 2021. Vol. 76, N 1. P. 33–40
- Федосеева Е. В., Данилова О. А., Януцевич Е. А., Терехова В. А., Терешина В. М. Липиды микромитозов и стресс // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 43–63.

СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ КУРИЛО-КАМЧАТСКОГО РЕГИОНА

Е. Н. Фролов, А. И. Мальцева, А. В. Гололобова
А. В. Лебединский, И. В. Кубланов

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, Москва
Федеральный исследовательский центр фундаментальных основ
биотехнологии РАН, Москва, e-mail: evgenii_frolov_89@mail.ru

Диссимиляционная сульфатредукция – важнейший природный процесс, который широко распространен в анаэробных местообитаниях, осуществляется прокариотами и играет ключевую роль не только в круговороте серы, но и оказывает огромное влияние на глобальный цикл углерода [Muyzer&Stams, 2008; Rabus et al., 2015]. Несмотря на большой интерес к физиологии и экологии сульфатредуцирующих прокариот, в настоящее время хорошо изучены только мезофильные представители данной физиологической группы, обитающие при нейтральных значениях pH, в то время как сведения об экстремофильных сульфатредуцирующих прокариотах и их механизмах адаптации к факторам внешней среды сильно ограничены. В первую очередь это касается термоацидофильных сульфатредуцирующих прокариот. Термоацидофильные микробные сообщества характерны для кислых термальных источников естественных геотермальных зон, которые в свою очередь связаны с зонами субдукции – линейно протяженных зон, вдоль которых происходит погружение одних блоков земной коры под другие. Курило-Камчатский регион, являясь частью глобальной системы Тихоокеанского Огненного Кольца, представляет собой одну из самых активных вулканических областей нашей планеты. Радиоизотопные эксперименты с ^{35}S -меченым сульфатом показали, что микробные сообщества горячих источников Курило-Камчатского региона активно восстанавливают сульфат, а применение культурального подхода, а также методов амплификации и высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов *dsrB* и 16S рРНК, позволило выявить микроорганизмы, ответственные за данный процесс [Frolov et al., 2021; Frolov et al., 2018; Frolov et al., 2017]. Было установлено, что сульфатредуцирующие прокариоты, относящиеся к филумам *Desulfobacterota* (*Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfosoma*, *Desulfacinum*), *Nitrospirota* (*Thermodesulfovibrio*) и *Firmicutes* (*Desulfurispora*, *Desulfotamaculum*,

Desulfothermobacter, *Ammonifex*) обитают в слабокислых горячих источниках со значениями pH от 5,1 до 6,6 и температурами от 52 до 72 °С, тогда как бактерии, принадлежащие к филуму *Thermodesulofibiota* (*Thermodesulofibium*), предпочитают умеренно кислые горячие источники с значениями pH от 4,2 до 5,0 и температурами от 53 до 65 °С. В горячем источнике с температурой 90 °С и pH 3,5 диссимиляционная сульфатредукция была опосредована археями рода *Vulcanisaeta* (филум *Crenarchaeota*), для которых ранее нами была продемонстрирована способность к диссимиляционной сульфатредукции [Chernyh et al., 2020]. Целью данной работы является исследование физиологии и метаболизма термоацидофильных сульфатредуцирующих прокариот кислых термальных источников Курило-Камчатского региона.

В ходе исследования метаболизма термоацидофильной сульфатредуцирующей бактерии *Thermodesulfovibrium acidiphilum* было показано функционирование III формы Рубис КО в автотрофном росте, а также впервые представлены доказательства существования трансальдозного варианта цикла Кальвина [Frolov et al., 2019]. Отличительной особенностью нового варианта цикла Кальвина является функционирование трансальдозы вместо седогептулозо-1,7-бисфосфат альдозы и фосфатазы, что приводит к более быстрому преобразованию термолабильных триозофосфатов в термостабильный фруктозо-6-фосфат, что, в свою очередь, имеет большое значение в условиях высоких температур. В рамках данной работы нами было показано наличие трансальдозного варианта цикла Кальвина у термофильных бактерий, относящихся к родам *Desulfothermobacter*, *Ammonifex* и *Thermodesulfitimonas*, образующих монофилитическую кладу внутри порядка *Thermoanaerobacterales* филума *Firmicutes*, а также у термофильных представителей рода *Methylacidiphilum*, относящегося к филуму *Verrucomicrobia*. Кроме того, было показано наличие генного кластера трансальдозного варианта цикла Кальвина у штамма 3907-1M, являющегося первым автотрофным представителем рода *Thermodesulfovibrio*. Интересно, что в группе *Ammonifex-Thermodesulfitimonas-Desulfothermobacter* были выявлены гены, кодирующие ферменты сразу двух путей фиксации CO₂ – трансальдозного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля. Отличительной особенностью трансальдозного варианта цикла Кальвина в группе *Ammonifex-Thermodesulfitimonas-Desulfothermobacter* является наличие бифункциональной фруктозо-1,6-бисфосфат альдозы/фосфатазы вместо двух отдельных ферментов, альдозы и фосфатазы, функционирующих в трансальдозном варианте цикла Кальвина у

Thermodesulfobium acidiphilum. Бифункциональность и однонаправленность данного фермента также гарантирует быстрое преобразование термолabileльных триозофосфатов.

Таким образом, было показано распространение трансальдолазного варианта цикла Кальвина среди термофильных прокариот. В сравнении с классическим вариантом цикла Кальвина трансальдолазный вариант обеспечивает более быстрое преобразование термолabileльных триозофосфатов в термостабильный фруктозо-6-фосфат, что имеет большое значение в условиях высоких температур.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации, проект МК-2776.2021.1.4.

Литература

Chernyh N. A., Neukirchen S., Frolov E. N., Sousa F. L., Miroshnichenko M. L., Merkel A. Y., Pimenov N. V., Sorokin D. Y., Ciordia S., Mena M. C., Ferrer M., Golyshin P. N., Lebedinsky A. V., Cardoso Pereira I. A., Bonch-Osmolovskaya E. A. Dissimilatory sulfate reduction in the archaeon '*Candidatus* Vulcanisaeta moutnovskia' sheds light on the evolution of sulfur metabolism // Nat. Microbiol. 2020. Vol. 5, N 11. P. 1428–1438.

Frolov E. N., Kublanov I. V., Toshchakov S. V., Samarov N. I., Novikov A. A., Lebedinsky A. V., Bonch-Osmolovskaya E. A., Chernyh N. A. *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., a thermoacidophilic, sulfate-reducing, chemoautotrophic bacterium from a thermal site // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67, N 5. P. 1482–1485.

Frolov E. N., Zayulina K. S., Kopitsyn D. S., Kublanov I. V., Bonch-Osmolovskaya E. A., Chernyh N. A. *Desulfothermobacter acidiphilus* gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68, N 3. P. 871–875.

Frolov E. N., Kublanov I. V., Toshchakov S. V., Lunev E. A., Pimenov N. V., Bonch-Osmolovskaya E. A., Lebedinsky A. V., Chernyh N. A. Form III RubisCO-mediated transaldolase variant of the Calvin cycle in a chemolithoautotrophic bacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. Vol. 116, N 37. P. 18638–18646.

Frolov E. N., Gololobova A. V., Klyukina A. A., Bonch-Osmolovskaya E. A., Pimenov N. V., Chernyh N. A., Merkel A. Y. Diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in Kamchatka hot springs // Microorganisms. 2021. Vol. 9, N 10. P. 2072.

Muyzer G., Stams A. J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2008. Vol. 6, N 6. P. 441–454.

Rabus R., Venceslau S. S., Wöhlbrand L., Voordouw G., Wall J. D., Pereira I. A. A Post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes // Adv. Microb. Physiol. 2015. Vol. 66. P. 55–321.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛИАМИНОВ НА ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ АДАПТАЦИИ К СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ *ESCHERICHIA COLI*

Е. А. Хаова^{1,2}, А. Г. Ткаченко^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, e-mail: info@iegm.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский
университет, Пермь

В стационарной фазе бактерии испытывают воздействие различных неблагоприятных факторов. В этот период формируются стрессорные ответы на голодание, накопление токсических продуктов обмена, закисление и другие стрессы. Для выживания в таких условиях необходимо формирование адаптивного состояния, результатом которого является изменение генно-экспрессионного профиля клетки [Ткаченко, 2012]. Значительную роль в этом процессе играют полиамины, представляющие собой биогенные поликатионы, которые участвуют в адаптации бактерий к стрессу, регуляции пролиферации и генной экспрессии [Tabor, 1985]. Описаны различные механизмы стимуляции генной экспрессии полиаминами на трансляционном уровне [Igarashi, 2010].

Целью настоящей работы является исследование регуляторных эффектов полиаминов на транскрипционную активность генов, участвующих в адаптации *Escherichia coli* к стационарной фазе: *rpoS*, *relA* и *spoT*, кодирующих регуляторы общего стрессорного ответа и голодания [Ткаченко, 2012]; *hms* и *stpA*, кодирующих глобальные регуляторы генной экспрессии [Johansson, 2001; Williams, 1997]; *rmf*, *yqjD*, *hpf*, *raiA*, *rsfS*, *sra*, *ettA*, кодирующих факторы гибернации рибосом [Prossliner, 2018]. Белки RelA и SpoT, являются гуанозинтетра(пента)фосфат-синтазой и гуанозинтетра(пента)фосфат-синтазой/гидролазой соответственно. Гуанозинтетра(пента)фосфат – это сигнал стресса, глобальный регулятор стринджен-ответа, одного из механизмов общего стрессорного ответа. RelA индуцируется в ответ на аминокислотное голодание, тогда как SpoT – в ответ на голодание и другие стрессы. RpoS представляет собой альтернативную σ^S -субъединицу РНК-полимеразы, ответственную за экспрессию регулона общего стрессорного ответа [Ткаченко, 2012]. ДНК-связывающие белки H-NS и StpA выполняют функции глобальных транскрипционных регуляторов [Johansson, 2001; Williams, 1997]. Факторы гибернации рибосом ингибируют трансляционную активность рибосом, от-

ответственны за формирование дормантного состояния клетки и препятствуют бесполезному расходованию ресурсов во время голодания [Prossliner, 2018].

Исследования проводили на полиамин-дефицитном мутанте *E. coli*, выращенном на минимальной среде M9 (+ 0,4 % глюкоза) без добавок (контроль) и с добавлением полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина по 0,1 мМ. Влияние полиаминов на генную экспрессию, сопряженную с обратной транскрипцией, исследовали методом ПЦР в реальном времени. Полученные данные нормализованы относительно тотальной РНК, концентрацию которой измеряли при помощи «NanoDrop 2000 Spectrophotometer» (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Также нами исследовано содержание полиаминов в среде и в клетках методом ТСХ.

Согласно результатам исследования, внутриклеточное содержание полиаминов в клетках постепенно возрастало к стационарной фазе и достигало максимальных значений на 24 ч культивирования, что сопровождалось снижением содержания полиаминов в среде. В этот период выявлен наибольший стимулирующий эффект полиаминов на экспрессию большинства исследуемых генов. Исключение составляли гены *stpA* и *raiA*, максимальная стимуляция экспрессии которых наблюдалась в экспоненциальной фазе роста. При этом наибольшее положительное влияние на их транскрипцию оказывали путресцин и кадаверин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольший эффект на основную часть исследованных генов оказывает спермидин. Показано, что гены *rpoS*, *relA* и *spoT*, кодирующие регуляторы общего стрессорного ответа и голодания, находятся преимущественно под контролем спермидина, а их максимальная стимуляция происходит в стационарной фазе, когда клетки подвержены воздействию различных стрессов. Регуляторный эффект полиаминов на гены *hns* и *stpA*, кодирующие ДНК-связывающие белки, дифференцирован во времени и характеризуется специфичностью по отношению к различным полиаминам. За наибольшую стимуляцию активности *stpA* наблюдаемую в экспоненциальной фазе, ответственны путресцин и кадаверин, тогда как активность *hns* максимально стимулируется спермидином в стационарной фазе. Это, по-видимому, связано с тем, что H-NS является глобальным репрессором и действует преимущественно в стационарной фазе. Гены *rmf* и *hpf* преимущественно находятся под контролем спермидина, и их максимальная стимуляция также происходит в стационарной фазе. Известно, что факторы RMF и HPF функционируют совместно, форми-

руя неактивные 100S димеры рибосом в стационарной фазе. Их антагонист, фактор RaiA, стабилизирует и инактивирует 70S мономеры рибосом. Ген *raiA*, в отличие от *rmf* и *hpf*, находится под контролем путресцина и кадаверина, и максимальная стимуляция его наблюдается в экспоненциальной фазе. Остальные же гены, кодирующие факторы гибернации рибосом, стимулируются в стационарной фазе и обладают специфичностью по отношению к различным полиаминам: *ettA* и *yqjD* – к путресцину, *rsfS* – к путресцину и спермидину, *sra* – к спермидину. Таким образом, стимулирующий эффект полиаминов на транскрипционную активность исследуемых генов специфичен по фазе культивирования и типу полиамина (табл.).

Таблица

Регуляторный эффект на транскрипционную активность генов специфичен по фазе культивирования и по типу полиамина

	Путресцин	Кадаверин	Спермидин
Экспоненциальная фаза	<i>stpA</i> <i>raiA</i>	<i>stpA</i> <i>raiA</i>	
Стационарная фаза	<i>ettA</i> <i>yqjD</i> <i>rsfS</i>	<i>relA</i> <i>hpf</i>	<i>relA</i> <i>spoT</i> <i>rpoS</i> <i>hns</i> <i>rmf</i> <i>hpf</i> <i>rsfS</i> <i>sra</i>

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-73-10156.

Литература

- Ткаченко А. Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов // Екатеринбург : УрО РАН. 2012. 268 с.
- Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2010. Vol. 42, N 1. P. 39–51.
- Johansson J., Eriksson S., Sonden B., Wal S., Uhlin B. Heteromeric Interactions among Nucleoid-Associated Bacterial Proteins: Localization of StpA-Stabilizing Regions in H-NS of *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. 2001. Vol. 183. P. 2343–2347.
- Prossliner T., Winther K. S., Sorensen M. A., Gerdes K. Ribosome hibernation // The Annual Review of Genetics. 2018. Vol. 52. P. 321–350.
- Tabor C. W., Tabor H. Polyamines in microorganisms // Microbiological Reviews. 1985. Vol. 49. P. 81–99.
- Williams R. M., Rimsky S. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks // FEMS Microbiology Letters. 1997. Vol. 156. P. 175–185.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР WhiA ОБРАЗУЕТ ПЕТЛЮ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ МЕТАБОЛИЗМОМ И ТРАНСЛЯЦИЕЙ У БАКТЕРИЙ С РЕДУЦИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

Е. А. Цой¹, Г. Ю. Фисунов¹, Д. В. Евсютина¹
В. А. Манувера², А. Д. Ведяйкин³, А. М. Варижук²
В. Б. Цветков², В. М. Говорун¹

¹ФБУН НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора
Москва, e-mail: eatsoy2012@gmail.com

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Санкт-Петербург

WhiA – это консервативный белок, присутствующий во многих микроорганизмах, включая бактерии с редуцированным (*Mollicutes*) и синтетическим геномом (JCVI-syn3.0). В его состав входит ДНК-связывающий домен НТН, который является типичным для бактериальных транскрипционных факторов, и домен HEN, гомологичный хоминг-эндонуклеазам семейства LAGLIDADG. При этом, в отличие от эндонуклеаз, WhiA не обладает нуклеазной активностью, связано это с отсутствием в активном центре ключевых аминокислотных остатков необходимых для этого. Хотя гомологи WhiA консервативны и распространены в бактериях, их общая функция неизвестна. Изучены лишь частные функции, характерные для узких групп бактерий. Например, было показано, что в *Streptomyces* белок входит в состав сложной сити, отвечающей за регуляцию спорообразования. Также у этих бактерий WhiA способен напрямую регулировать гены, участвующие в клеточном делении (*parA*, *parB* и *ftsZ*). Для *Streptomyces* был идентифицирован сайт связывания WhiA, который представляет собой пентамер GACAC [Kaiser, 2011]. Для *B. subtilis* показано, что WhiA играет малопонятную роль в сегрегации и поддержании целостности хромосом, однако не участвует в спорообразовании [Bohorquez, 2018]. Нокаут WhiA приводит к жизнеспособному фенотипу как *Streptomyces*, так и *Bacillus*. Однако двойной нокаут WhiA и *parAB* *B. subtilis* дает летальный фенотип. Было доказано, что у *Corynebacterium glutamicum* WhiA входит в состав ДНК комплекса с белком WhcD и регулирует экспрессию генов клеточного деления [Lee, 2018].

Интересной особенностью данного белка является то, что он присутствует в бактериях, класса *Mollicutes*, в том числе в микоплазмах.

Все Mollicutes имеют в той или иной степени редуцированные геномы. У микоплазм степень редукции генома достигает максимума. Репертуар транскрипционных факторов микоплазм в среднем не превышает десяти. При этом наиболее консервативными (представлены почти во всех отсековенных геномах за единичным исключением) являются четыре: регулятор клеточного деления MraZ, репрессор теплового шока HrcA, белок семейства YebC/PmpR с еще неизвестной функцией и WhiA [Fisunov, 2016]. Наличие последовательности, кодирующей WhiA в микроорганизмах с минимальным геномом, указывает на важную роль, которую играет этот белок.

В связи с вышесказанным целью данной работы стало изучение функции белка WhiA.

В начале нами был проведен анализ консервативности WhiA и оперонной структуры у бактерий, относящихся к разным классам. Полученные результаты позволяют предположить, что консервативной мишенью WhiA является оперон, кодирующий рибосомные и некоторые другие белки (оперон *rpsJ*).

На следующем этапе мы исследовали гомологичные белки, экспрессирующийся в модельном микроорганизме *Bacillus subtilis* и в *Mycoplasma gallisepticum*, представителя Mollicutes. В ходе работы было выявлено, что каждый из доменов WhiA способен распознавать и связывать определенную нуклеотидную последовательность. При этом сайт связывания GAYACRCY (Y=C или T, R = A или G), основной для образования ДНК-белкового комплекса, является целевым для НТН домена, а HEN отвечает за взаимодействие с дополнительным мотивом. Мы определили, что белки, относящиеся к этому семейству, чувствительны к изменениям концентраций макроэргов (АТФ и АДФ) в клетке. Однако WhiA из *M. gallisepticum*, в отличие от *B. subtilis*, реагирует на колебания только АТФ. При этом, увеличение в клетке концентрации этого нуклеотида приводит к диссоциации HEN домена от ДНК в районе дополнительного мотива (GTTGT). Это позволило нам сделать вывод о том, что WhiA, экспрессирующийся в Mollicutes, является транскрипционным репрессором, рецептором концентрации АТФ. НТН-домен WhiA выполняет функцию распознавания целевого промотора, HEN-домен отвечает за восприятие концентрации АТФ. Мы предполагаем, что при снижении концентрации АТФ в клетке, WhiA связывается с промоторной областью оперона *rpsJ*, тем самым, не давая полимеразе осуществлять транскрипцию генов, кодирующих рибосомные белки. Повышение кон-

центрации АТФ ведет к диссоциации HEN-домена от сайта связывания, в результате чего открывается промотор этого оперона и начинается транскрипция генов, кодирующих рибосомные белки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 19-74-10105.

Литература.

Kaiser B. K. and Stoddard B. L. DNA recognition and transcriptional regulation by the WhiA sporulation factor // *Sci. Rep.* 2011. Vol. 1. P. 1–9.

Bohorquez L. C., Surdova K., Jonker M. J., and Hamoen L. W. The Conserved DNA Binding Protein WhiA Influences Chromosome Segregation in *Bacillus subtilis* // *J.Bacteriol.* 2018. P. 1–17.

Lee D. S., Kim P., Kim E. S., Kim Y., and Lee H. S. *Corynebacterium glutamicum* WhcD interacts with WhiA to exert a regulatory effect on cell division genes // *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2018. Vol. 111, № 5. P. 641–648.

Fisunov G. Y., Garanina I. A., Evsyutina D. V., Semashko T. A., Nikitina A. S., and Gorvun V. M. Reconstruction of Transcription Control Networks in Mollicutes by High-Throughput Identification of Promoters // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. P. 1977.

УЧАСТИЕ ПОЛИАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ СКОЛЬЖЕНИЯ *Mycobacterium smegmatis* В ПРИСУТСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

И. В. Цыганов^{1,2}, А. Г. Ткаченко^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь.

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

Скольжение (sliding motility) – это пассивный тип распространения, характерный для некоторых бактерий, не имеющих органелл движения, таких как жгутики или пили. Движение клеток происходит за счет действия экспансивной силы, возникающей при делении клеток и давлении их друг на друга [Henrichsen, 1972]. В результате образуется монослой клеток, нехарактерный для полностью неподвижных видов [Kobayashi et al., 2016]. Микобактерии считались неподвижными микроорганизмами до тех пор, пока не было обнаружено, что они могут скользить по поверхностям полужидких сред. Впоследствии было установлено, что ключевым фактором скольжения микобактерий является наличие гликопептидолипидов в клеточной стенке [Martínez et al., 1999]. Таким образом, благодаря скольжению, микобактерии способны быстро распространяться по поверхностям полужидких сред с концентрацией агара 0,1–0,5 %, сходных со слизистыми оболочками многоклеточных.

Исследование особенностей движения микобактерий представляет большой интерес ввиду того, что к представителям данного рода относятся возбудители туберкулезной инфекции, в частности туберкулеза человека. Туберкулез является одной из ведущих причин смертности в мире. Около четверти населения мира инфицировано туберкулезом, и ежегодно, приблизительно, 10 миллионов человек заболевают туберкулезом [WHO, 2019]. Все это обуславливает перспективность поиска более эффективных методов противодействия данной инфекции.

Сотрудниками Пермского национального исследовательского университета был синтезирован синтетический аналог природного дитерпенаэрогоргиана – DMNP –, который, как показано сотрудниками лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, обладает антимикобактериальной активностью [Incerti-Pradillos et al., 2016]. Этими работами установлено, что мишенями DMNP являются алармонсинтеазы микобактерий Rel_{msm} и $RelZ$, регулирующие внутриклеточный уровень алармона–гуанозинтетрафосфата (p)ppGpp, от которого зависит формирование микобактериальных биопленочных сообществ [Tkachenko, 2021].

В связи с этим, целью данной работы является исследование эффективности DMNP в отношении скользящих колоний микобактерий в сравнении с известными противотуберкулезными антибиотиками – рифампицином, стрептомицином и изониазидом, а также роль биогенных полиаминов в этом процессе.

В ходе исследования установлено, что штамм с одинарной делецией гена rel_{msm} демонстрировал повышенную способность к скольжению: площади скользящих колоний данного штамма превосходили площади колоний штаммов без делеций и с двойной делецией генов rel_{msm} и $relZ$. При добавлении в среду полиаминов спермидина и спермина в физиологических концентрациях, равных 2 мМ, площади колоний менялись разнонаправлено. В присутствии спермидина площади скользящих колоний увеличивались у всех трех штаммов. Наибольший эффект спермидин оказывал на штамм с одинарной делецией гена rel_{msm} . В то же время при добавлении в среду для скольжения спермина, все штаммы демонстрировали уменьшение площадей скользящих колоний. Сильнее всего уменьшалась площадь колоний у штамма с двойной делецией генов rel_{msm} и $relZ$.

При добавлении сублетальных концентраций антибиотиков в среду для скольжения наибольший эффект демонстрировал рифампицин, который уменьшал площадь скользящей колонии до места ино-

куляции при минимальной концентрации, равной 0,1 МПК. Остальные антибиотики демонстрировали аналогичный результат при кратных концентрациях, равных 0,5–1 МПК.

При совместном действии исследованных антибиотиков и биогенных полиаминов установлено, что используемые в противотуберкулезной терапии рифампицин, стрептомицин и изониазид в присутствии спермидина и спермина демонстрировали пониженную активность: площади колоний были больше, чем при аналогичной концентрации антибиотика в отсутствие полиаминов. Обратная картина наблюдалась при совместном действии полиаминов и DMNP, когда добавка полиаминов сопровождалось снижением площадей скользящих колоний. Совместный эффект DMNP и полиаминов усиливался пропорционально числу генных делеций в использованных нами штаммах. Несмотря на то что спермидин повышал площадь колоний, при увеличении сублетальных концентраций антибиотика, площади скользящих колоний уменьшались сильнее, чем в чашках без спермидина. Поскольку скольжение является пассивным способом перемещения, главную роль в механизме подвижности у микобактерий является концентрация гликопептидолипидов в клеточной стенке, а также свойства поверхности. Все биогенные полиамины обладают положительным зарядом, который зависит от числа амино- и имино-групп в их составе. Известно, что полиамины изменяют дзета-потенциал клеточной поверхности, уменьшая отрицательный заряд клетки пропорционально силе заряда поликатиона [Nesterova et al., 2020]. Поэтому разнонаправленный эффект полиаминов спермидина и спермина в отношении скольжения микобактерий, вероятно, обусловлен не изменением поверхностного заряда клеток, а модуляцией внутриклеточных процессов, регулирующих синтез гликопептидолипидов, например, изменения уровня алармона (p)ppGpp и активности алармонсинтетаз, которые являются мишенями для DMNP.

Таким образом, несмотря на то что DMNP не обладает наиболее сильным эффектом из исследованных нами антибиотиков в отношении скользящих колоний микобактерий, его эффект усиливается в присутствии биогенных полиаминов, высокие концентрации которых присутствуют в тканях многоклеточных организмов. Данный факт делает перспективной разработку на его основе лекарственных средств против туберкулезных инфекций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ААА-А19-

Литература

- Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification // *Bacteriological Reviews*. 1972. Vol. 36. P. 478–503.
- Incerti-Pradillos C. A., Kabeshov M. A., O'Hora P. S. et al. Asymmetric Total Synthesis of (-)-Erogorgiaene and Its C-11 Epimer and Investigation of Their Antimycobacterial Activity // *Chemistry*. 2016. Vol. 22. P. 14390–14396.
- Kobayashi K., Kanasaki Y., Yoshikawa H. Genetic Analysis of Collective Motility of *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 // *PLOS Genetics*. 2016. Vol. 12, N 10. e1006387.
- Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria // *Journal of Bacteriology*. 1999. Vol. 181. P. 7331–7338.
- Nesterova L. Yu., Tsyganov I. V., Tkachenko A. G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. P. 387–394.
- Tkachenko A. G., Kashevarova N. M., Sidorov R. Y., Nesterova L. Y., Akhova A. V., Tsyganov I. V., Vaganov V. Y., Shipilovskikh S. A., Rubtsov A. E., Malkov A. V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // *Cell chemical biology*. 2021. N 28. P. 1–13.
- WHO. Global tuberculosis report 2019. Geneva, 2019.

ФОТОЗАЩИТНАЯ РОЛЬ ОПТИЧЕСКОГО ЭКРАНИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ ЗЕЛеноЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *COELASTRELLA RUBESCENS*

К. А. Чеканов¹, А. А. Зайцева¹, П. А. Зайцев¹, Д. А. Бахарева¹
О. А. Горелова¹, Д. В. Кочкин^{1,2}, Е. С. Лобакова¹

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

²Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

Микроводоросль наземно-воздушной среды *Coelastrella rubescens* как правило обитает в условиях избыточной солнечной радиации [Kaufnerová, Eliáš, 2013], поэтому она должна иметь эффективные защитные механизмы [Karsten, Rindi, 2010]. К ним можно отнести работу ферментов репарации ДНК и нейтрализации активных форм кислорода, восстановление поврежденных структур клеток, нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла, разборку фотосинтетического аппарата и оптическое экранирование [Cockell, Knowland, 1999; Solovchenko et al., 2019]. Неоспоримым преимуществом экранирования является то, что оно защищает клетку еще до того, как молекулы-фотосенсибилизаторы поглотили свет и повреждение, индуцируемое электромагнитным излучением, произошло [Cockell, Knowland, 1999]. Эти же авторы предложили критерии фотопротектора, ставшие классическими: 1) соединение должно поглощать электромагнитное излучение из видимого и/или УФ-диапазона;

2) его накопление должно индуцироваться излучением; 3) накопление протектора должно снижать риск фотоповреждения.

Целью работы было обнаружение и характеристика арсенала фотозащитных соединений штамма микроводоросли *C. rubescens* NAMSUR1. Для их выявления культуру подвергали электромагнитному излучению высокой интенсивности из видимой области спектра и УФ-А в течение двух недель и оценили способность суспензий клеток водоросли и полученных из них экстрактов полярных и неполярных соединений поглощать видимое и УФ излучение.

Облучение ультрафиолетом приводило к появлению в экстрактах соединений, поглощающих излучение в УФ и сине-зеленой области спектра. Усиление поглощения в видимой области также наблюдали для суспензий клеток. Анализ спектров возбуждения хлорофилла *a* показал ослабление интенсивности флуоресценции в областях спектра, где наблюдали усиление поглощения после облучения. Следовательно, соединения, накопление которых индуцировано излучением высокой интенсивности, способны снижать количество энергии, поглощаемой хлорофиллом. Физиологическим смыслом этого является снижение риска фотоповреждения в клетках [Cockell, Knowland, 1999; Solovchenko et al., 2019]. Помимо этого, соединения, поглощавшие УФ излучение, могли снижать уровень фотодеструкции ДНК, нуклеиновых кислот и белков [Cockell, Knowland, 1999; Karsten, Rindi, 2010].

Анализ химической природы потенциальных фотопротекторов определяли при помощи тонкослойной хроматографии и тандемной высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии с предварительной электроспрей-ионизацией. *C. rubescens* накапливала ряд каротиноидов, поглощавших свет в сине-зеленой области спектра (такие как астаксантин, α - и β -каротин), и микоспорин-подобные аминокислоты, поглощавшие УФ-А. Были идентифицированы две ранее неизвестные микоспорин-подобные аминокислоты: микоспорин-глицин: γ -дегидровалин и (7-*O*-гликозил)-микоспорин-глицин: γ -дегидровалин, для которых были предложены названия целастрин А и целастрин В, соответственно.

В спектрах поглощения полярных экстрактов также наблюдали увеличение амплитуды пиков в УФ-В области, что могло быть объяснено накоплением соединений фенольной природы, однако подробное изучение их химической структуры должно стать целью дальнейших работ. Анализ спектров поглощения суспензий клеток в УФ-области также показал наличие в клеточных стенках трехламеллярного

слоя спорополнения-подобных веществ, также эффективно поглощающих УФ и являющихся классическими фотопротекторами. Их присутствие было подтверждено методом трансмиссионной электронной микроскопии. Тем не менее, из формы дифференциальных спектров можно сделать вывод, что накопление спорополнения-подобных полимеров не индуцировалось излучением: они являлись конститутивными фотопротекторными агентами. Облучение клеток УФ-А не приводило к существенному снижению фотохимического квантового выхода фотосистемы II (в сравнении с облучением только ярким светом в видимой области), но вызывало в клетках снижение уровня нефотохимического тушения. Следовательно, индуцируемое УФ накопление фотопротекторов могло снижать уровень фотоингибирования.

Полученные результаты свидетельствуют, что *C. rubescens* NAMSUR1 может в будущем рассматриваться как продуцент фотозащитных соединений в биотехнологии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-74-100028.

Литература

Karsten U., Rindi F. Ecophysiological performance of an urban strain of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium* sp. (Klebsormidiales, Klebsormidiophyceae) // European Journal of Phycology. 2010. Vol. 45. P. 426–435.

Kaufnerová V., Eliáš M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. 2013. Vol. 97. P. 415–428.

Cockell C. S., Knowland J. Ultraviolet radiation screening compounds // Biological Reviews. 1999. Vol. 74. P. 311–345.

Solovchenko A. et al. Ultrastructural patterns of photoacclimation and photodamage to photosynthetic algae cell under environmental stress // Physiologia plantarum. 2019. Vol. 166. P. 251–263.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ААЛКАНМОНООКСИГЕНАЗЫ *alkB* У ШТАММОВ УГЛЕВОДОРОДООКСИЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Т. Н. Шапиро, Е. С. Лобакова, Н. А. Манучарова

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, e-mail: floyd52@rambler.ru; manucharova@mail.ru

Нефтепродукты (НП) представляют собой основной источник энергии в хозяйственной деятельности и жизни человека. Сообщения о биологическом загрязнении НП и в первую очередь различных видов авиационного и автомобильного топлива значительно возросли в последние годы [Martín-Sánchez et al., 2018]. Принято считать, что

прямые и косвенные потери от микробиологически обусловленной коррозии нефти и НП в промышленно развитых странах составляют от 2 до 5 % годового валового внутреннего продукта [Каримова, 2007]. Исследование способности штаммов углеводород окисляющих бактерий (УОБ), выделенных из НП, к использованию н-алканов, играет важную роль как для утилизации НП при авариях, так и их защиты от биоповреждений. Детекция ключевых генов, ответственных за окисление определенных компонентов НП, является прямым доказательством использования УОБ углеводородов, а также их метаболической активности микроорганизма. Моноксигеназа *alkB* широко распространена у бактерий и окисляет алканы с длиной цепи до C₁₆ [Wasmund et al., 2009].

Целью работы было изучение экспрессии гена *alkB*, кодирующего фермент алканмоноксигеназу у штаммов УОБ, выделенных из образцов реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95 [Shapiro et al., 2021].

Для количественного анализа числа копий ДНК, содержащих функциональный ген *alkB*, отвечающий за деградацию н-алканов, использовали метод Realtime PCR (RT-PCR). Измерение проводили на детектирующем амплификаторе DTLite4 ДНК-Технология после 7 сут. культивирования штаммов УОБ на среде Rich [Лысак, 2003], по методике, описанной в [Manucharova et al., 2021]. Последовательности праймеров, используемых для выявления штаммов УОБ, обладающих функциональным геном *alkB*: F(TGGCCGGC-TACTCCGATGATCGGAATCTGG);R(CGCGTGGTGATCCGAGTGC CGCTGAAGGTG) [Whyte et al., 2002]. Количество исследуемой ДНК выражали в абсолютных или относительных единицах. Количественное определение матрицы ДНК проводили при наличии трех стандартов и отрицательного контроля (образца без матрицы ДНК).

Все выделенные из образцов реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95 штаммы УОБ изучены на наличие гена *alkB*. Показано, что 5 из 9 выделенных штаммов УОБ из топлива ТС-1 (*Sphingobacterium multivorum* Vi2; *Alcaligenes faecalis* Vi3; *Rhodococcus* sp. Vi4; *Sphingobacterium* sp. Vi5; *Rhodococcus erythropolis* Vi6), содержат ген *alkB*. У бактерий, выделенных из бензина АИ-95, данный ген не был детектирован. Эти результаты согласовались с данными по способности выделенных штаммов к росту на жидких и твердых средах в присутствии 1 % н-алканов с разной длиной углеродной цепи [Shapiro et al., 2021]. Однако для некоторых выделенных штаммов УОБ был показан рост и высокая активность в отношении деградации н-алканов при отсутствии данного гена. Для подтверждения наличия

и экспрессии данного гена проведен количественный анализ числа копий ДНК, содержащих функциональный ген алканмонооксигеназы у выделенных штаммов УОБ. По результатам проведенного RT-PCR установлено, что ген *alkB* экспрессируется у всех выделенных штаммов УОБ. По эффективности экспрессии все штаммы были разделены на две группы: первая группа с наибольшей экспрессией гена *alkB*, для которой значения концентрации достигали от 1290 до 8060 копий/мл, и вторую группу – где значения концентрации были на порядок ниже и колебались в пределах от 10,4 до 786 копий/мл. Методом RT-PCR удалось установить количественное наличие копий гена *alkB* у всех штаммов УОБ выделенных из НП, тогда как ранее данный ген был детектирован (метод PCR) только у 5 из 13 штаммов. Так, все штамма УОБ, выделенные из бензина АИ 95, также показали экспрессию гена *alkB*, аштамм *Paenibacillus agaridevorans* В11 был отнесен в первой группе штаммов с высоким уровнем его экспрессии (1290 копий/мл).

Таким образом, методом Realtime PCR обнаружена экспрессия гена *alkB* у всех штаммов УОБ, выделенных из реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95. Показано существенное количественное различие по экспрессии данного гена у выделенных штаммов. Для штаммов, выделенных из бензина данные по экспрессии, соответствуют ранее полученным физиолого-биохимическим данным о росте в присутствии модельной смеси углеводов и эффективности их деградации [Shapiro et al., 2021]. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости использования комплекса методов (полифазного подхода) для всесторонней оценки способности штаммов УОБ к биodeградации углеводов НП.

Литература

- Каримова С. А. Коррозия – главный враг авиации // Наука и жизнь. 2007. № 6. С. 63–65.
- Лысак Л. В., Скворцова И. Н., Добровольская Т. Г. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М. : МАКС пресс, 2003. 120 с.
- Manucharova N. A. et al. Metabolically Active Prokaryotic Complex in Grassland and Forests' Sod-Podzol under Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Influence // Forests. 2021. Vol. 12, N 8. Art. 1103.
- Martin-Sanchez P. M., Becker R., Gorbushina A. A., Toepel J. An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms // International Biodeterioration & Biodegradation. 2018. Vol. 129. P. 89–94.
- Shapiro T. N. et al. Community of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in Petroleum Products on the Example of TS-1 Jet Fuel and AI-95 Gasoline // Applied Biochemistry and Microbiology. 2021. Vol. 57. P. 949–961.
- Wasmund K., Burns K. A., Kurtböke D. I., Bourne D. G. Novel alkane hydroxylase gene [*alkB*] diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia // Appl. Environ. Microbiol. 2009. Vol. 75. P. 7391–7398.
- Whyte L. G. et al. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils // FEMS Microbiology Ecology. 2002. Vol. 41, N 2. P. 141–150.

**АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ К УСЛОВИЯМ
ОБИТАНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА
(ЖИВОТНОЕ, РАСТЕНИЕ, ЧЕЛОВЕК)**

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-
КОММЕНСАЛОВ КОЖИ И СИСТЕМ ГУМОРАЛЬНОЙ
РЕГУЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА**

А. В. Ганнесен^{1,*}, С. В. Мартъянов¹, Е. Д. Неволина¹,
М. А. Овчарова¹, Е. В. Дювенжи¹, Н. Д. Данилова¹, А. А. Киселева¹,
О. В. Гераськина², М. В. Журина¹, М. И. Щелкунов^{3,4},
Р. Х. Зиганьшин⁵, В. М. Терешина¹, Е. А. Януцевич¹,
О. А. Данилова¹, А. В. Феофанов^{2,5}, Э. Л. Здоровенко⁶,
Е. А. Бочкова¹, В. К. Плакунов¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

³ Сколковский институт науки и технологий

⁴ Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича, Москва

⁵ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина

и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

⁶ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

* e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

В последние десятилетия накоплено много данных о взаимодействии микробиоты человека с системами гуморальной регуляции, в связи с чем выделилось отдельное направление исследований – микробная эндокринология. У ряда энтеробактерий показано наличие специфических систем кворум-сенсинга, в которых молекулы катехоламинов играют роль сигнальных соединений [Reading et al., 2007]. Показано наличие аналогов рецепторов натрийуретических пептидов

у синегнойной палочки [Roasy et al., 2015], а также влияние эстрадиола на системы кворум-сенсинга у *Prevotella aurantiaca* [Fteita et al., 2017]. Однако механизмы действия гормонов на рост большинства комменсальных микроорганизмов остаются невыясненными.

Было исследовано действие адреналина, норадреналина, натрийуретических пептидов и эстрадиола на моновидовые и мультивидовые биопленки ряда грамположительных микроорганизмов-комменсалов кожи человека. Было показано, что все исследованные гормоны так или иначе влияют на рост биопленок и оказывают регуляторное воздействие на сообщества, причем действие каждого гормона было индивидуально и зависело от концентрации, условий культивирования и вида микроорганизмов, на котором изучалось действие. Мы показали, что адреналин обладает стимулирующим действием на рост биопленок *Micrococcus luteus*, что выражается в изменении синтеза матрикса, увеличению количества биомассы, а также изменении экспрессии семи генов [Danilova et al., 2020; Gannesen et al., 2021]. Норадреналин в различных концентрациях оказывает ингибирующее действие на рост биопленок близкого к микрококкам штамма *Kytococcus schroeteri* [Danilova et al., 2021]. Также норадреналин в концентрации $3,5 \cdot 10^{-7}$ М усиливает конкурентные свойства *Staphylococcus epidermidis* в сообществе с *Staphylococcus aureus*, что доказывает регуляторную роль гормона на микробиоту [Mart'yanov et al., 2021]. Натрийуретический пептид А-типа также оказывает регуляторное воздействие на сообщество микроорганизмов *S. epidermidis* и *Cutibacterium acnes*: в его присутствии кутибактерии росли активнее, и количество их биомассы в сообществе увеличивалось. Стимулирующий эффект пептида наблюдали и в случае моновидовых биопленок *C. acnes* [Ovcharova et al., 2021]. Эстрадиол и этанол (как растворитель для эстрадиола) оказывают противоположные эффекты на рост биопленок *M. luteus* и молочнокислой бактерии *Lacticaseibacillus paracasei*, которая обитает на слизистой оболочке влагалища. Эстрадиол стимулирует рост биопленок микрококков и подавляет его у лактобацилл, тогда как этанол в свою очередь подавляет рост биопленок микрококков и стимулирует его у лактобацилл. В сообществе данных микроорганизмов соотношение видов зависит от системы, в которой выращиваются биопленки, однако микрококк, по-видимому, оказывает стимулирующий эффект на рост лактобацилл. При этом в системе, где биопленки растут в равновесии с планктонными культурами, лактобациллы доминируют над микрококком благодаря в том числе синтезу антибактериальных соединений. В системах без равновесия с

планктонной культурой микрококки быстрее формируют зрелую биопленку, что позволяет им успешно противостоять антимикробным соединениям лактобацилл и в конечном итоге быть доминирующим компонентом сообщества. По-видимому, влияние гормона на *L. paracasei* обусловлено в том числе изменением синтеза бактериоцинов.

Таким образом, было получено множество новых свидетельств взаимодействия факторов гуморальной регуляции человека и его микробиоты (в нашем случае – комменсалов кожи человека). Эти данные позволяют расширить исследования микробиоты человека, а также приблизиться к пониманию взаимодействия нашего организма с его микробиотой.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ №19-74-10071.

Литература

Danilova N. D., Geraskina O. V., Diuvenji E. V., Feofanov A. V., Plakunov V. K., Gannesen A. V. Inhibitory effect of norepinephrine on biofilm growth of the human skin commensal *Kyococcus schroeteri* H01 // *Microbiology*. 2021. Vol. 90, № 5. P. 666–669.

Danilova N. D., Solovyeva T. V., Mart'yanov S. V., Zhurina M. V., Gannesen A. V. Stimulatory effect of epinephrine on biofilms of micrococcus luteus C01 // *Microbiology*. 2020. Vol. 89, № 4. P. 493–497.

Fteita D., Musrati A. A., Könönen E., Ma X., Gürsoy M., Peurla M., Soderling E., Sintim H. O., Gürsoy U. K. Dipeptidyl peptidase IV and quorum sensing signaling in biofilm-related virulence of *Prevotella aurantiaca* // *Anaerobe*. 2017. Vol. 48. P. 152–159.

Gannesen A. V., Schelkunov M. I., Geras'kina O. V., Makarova N. E., Sukhacheva M. V., Danilova N. D., Plakunov V. K. Epinephrine affects gene expression levels and has a complex effect on biofilm formation in *Micrococcus luteus* strain C01 isolated from human skin // *Biofilm*. 2021. 100058.

Mart'yanov S. V., Botchkova E. A., Plakunov V. K., Gannesen A. V. The impact of norepinephrine on mono-species and dual-species staphylococcal biofilms // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, № 4. P. 820.

Ovcharova M. A., Geraskina O. V., Danilova N. D., Botchkova E. A., Mart'yanov S. V., Feofanov A. V., Plakunov V. K., Gannesen A. V. Atrial natriuretic peptide affects skin commensal *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* dual-species biofilms // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, N 3. 552.

Reading N. C., Torres A. G., Kendall M. M., Hughes D. T., Yamamoto K., Sperandio V. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin // *Journal of bacteriology*. 2007. Vol. 189, № 6. P. 2468–2476.

Rosay T., Bazire A., Diaz S., Clamens T., Blier A. S., Mijouin L., ... Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation // *MBio*. 2015. Vol. 6, N 4. e01033-15.

МЕТАТРАСКРИПТОМИКА И ПАРНАЯ ТРАСКРИПТОМИКА ПАТОСИСТЕМ

Ю. В. Гоголев^{1,2}, Н. Е. Гоголева^{1,2}, Е. В. Осипова¹
. А. Коннова¹, Х. Хамо², А. С. Балкин³

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН
Казань, e-mail: gogolev.yuri@gmail.com

²Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань
e-mail: hamza1halabr@gmail.com

³Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
Оренбург, e-mail: balkinas@yandex.ru

Несмотря на бурное развитие высокопроизводительного секвенирования, изучение бактериальных РНК остается сложной задачей. В первую очередь это вызвано неожиданной сложностью транскриптомов бактерий. Значительную долю в них составляет некодирующая РНК (нкРНК), которая представлена множеством вариантов, различающихся по происхождению, размеру молекул и копияности в клетке [Sharma, Vogel, 2014]. Было показано, что некоторые нкРНК бактерий действуют в качестве негативных регуляторов активности генов, а также могут служить факторами противофагового иммунитета. Однако функциональная роль большей части нкРНК бактерий остается не выясненной. Несмотря на то что *E. coli* – хорошо изученный модельный организм, точные позиции и количество сайтов инициации транскрипции (TSS) для большинства выявляемых транскриптов не известно. Данные элементы важны в масштабах структуры прокариотического генома, так как знание расположения сайтов старта транскрипции поможет в определении промоторов, структуры оперонов, 5'-нетранслируемой области и идентификации антисмысловой и некодирующей РНК.

Сложность для изучения бактериальных патогенов в патосистемах заключается в том, что в смешанных транскриптомах бактерий и организмов-хозяев бактериальная РНК, как правило, составляет несколько процентов. Разработка метода Carrable-Seq, основанного на селекции транскриптов, содержащих 5'-концевые трифосфаты, предоставляет дополнительные возможности для исследования сложных транскриптомов [Ettwiller et al., 2016]. Применение этого метода позволило нам провести картирование более 20 тыс. TSS с точностью до одного нуклеотида и транскриптомный анализ некоторых патогенных бактерий непосредственно в тканях и клетках эукариотических организмов. Показано, что для этих бактерий количество сайтов инициации транскрипции также многократно превышает количество картированных генов.

Эксперименты по секвенированию РНК проведены в рамках задания ФИЦ КазНЦ РАН. Микробиологическая часть работы выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Литература

Ettwiller L. et al. A novel enrichment strategy reveals unprecedented number of novel transcription start sites at single base resolution in a model prokaryote and the gut microbiome // BMC Genomics. 2016. Vol. 17, № 1. P. 1–14.

Sharma C. M., Vogel J. Differential RNA-seq: The approach behind and the biological insight gained // Curr. Opin. Microbiol. 2014. Vol. 19, № 1. P. 97–105.

СЕКЦИОННЫЕ ДОКЛАДЫ

АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS VELEZENSIS* К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ В РАСТИТЕЛЬНОМ ОРГАНИЗМЕ

Д. Л. Басалаева¹, К. А. Роденко¹,
М. И. Никельшпарг¹ С. С. Евстигнеева², Е. В. Глинская¹

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, e-mail: dbasalaewa@yandex.ru

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН), Саратов
e-mail: stels20295@yandex.ru

Ассоциативные взаимоотношения бактерий и растений рассматриваются как форма симбиоза, молекулярные механизмы которого связаны с разнообразием метаболитов партнеров. Важную роль для растительного организма играют как эпифитные, так и эндофитные микроорганизмы [Коннова, 2010]. Для адаптации на поверхности и внутри растений микроорганизмы должны обладать ферментативными системами для использования в качестве источников углерода компонентов растительных клеток, способностью усваивать различные формы азота (молекулярный азот атмосферы, соли азотсодержащих кислот и аммония, органический азот аминокислот и белков), способностью выживать при различных значениях температурного фактора и рН среды.

Целью исследования являлась оценка адаптационных свойств штамма *Bacillus velezensis* HR13.

В ходе исследования использовался штамм бактерий *Bacillus velezensis* HR13, выделенный с поверхности листьев ястребинки мочучей *Hieracium robustum* Fr. s. L., 1848 в 2018 г. [Басалаева, 2019].

Для оценки адаптационного потенциала было проведено исследование биохимических свойств бактерий *B. velezensis* HR13. Были изучены сахаролитические свойства, определена способность исследуемого штамма к росту в экстремальных условиях культивирования, способность к трансформации азотсодержащих соединений и способность к синтезу ферментов, разлагающих молекулы аминокислот.

Сахаролитическую активность изучали при помощи посевов на среды Гисса с сахарозой, глюкозой, мальтозой, арабинозой, сорбитом, лактозой, ксилозой, фруктозой, дульцитом, рамнозой, рибозой, рафинозой, инозитом и маннитом. Диапазон устойчивости исследуемого штамма к экстремальным условиям культивирования изучали путем определения способности к росту при различных температурах, значении водородного показателя и содержании в среде NaCl [Петерсон, 2005]. Способность к азотфиксации оценивали на среде Эшби, способность к аммонификации – на 1 % пептонном агаре, способность к нитрификации – на среде Виноградского, а способность к денитрификации – на ГРМ-агаре с 0,1 % нитрата калия. Все посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24 ч. Посевы на ГРМ-агаре с нитратом калия инкубировали в эксикаторе [Умаров, 2007]. Способность к ферментативному расщеплению аминокислот лизина, орнитина и фенилаланиндезаминазы изучали при помощи бумажных индикаторных систем (СИБ).

В ходе определения сахаролитической активности было выяснено, что исследуемый штамм *B. velezensis* HR13 способен использовать в качестве источников углерода глюкозу, лактозу, ксилозу, фруктозу, рибозу и инозит. При культивировании исследуемого штамма в различном диапазоне температур было выяснено, что температурный оптимум лежит в границах от 18 до 37 °С. Результаты культивирования при различных значениях pH показали, что исследуемый штамм способен к росту при показателях pH от 5,0 до 11,0. Культивирование при различной концентрации NaCl в среде показало, что исследуемый штамм способен расти при максимальном количестве в 4 %, что соответствует понятию факультативных галофилов. Изучение способности к трансформации различных азотсодержащих соединений показало, что исследуемый штамм способен к азотфиксации, аммонификации и денитрификации. Из изученных нами декарбоксилаз аминокислот исследуемый штамм способен к расщеплению лизина до амина и углекислого газа.

В результате исследования была определена способность исследуемого штамма к росту в различных экстремальных условиях и использованию различных источников углерода и азота. Рост в кислой среде и при различных значениях температурного фактора, использование различных неорганических и органических соединений азота определяет адаптационный потенциал бактерий *B. velezensis* HR13. Способность адаптироваться к широкому диапазону физико-химических факторов открывает для исследуемых бактерий пути для ассоциативных симбиотических взаимоотношений с растениями, в результате которых обе стороны получают выгоду: бактерии получают большое количество разных источников питательных веществ, а растения могут использовать продукты метаболизма бактерий.

Литература

- Басалаева Д. Л., Шестакова А. С., Никельшпарг М. И., Глинская Е. В. Антагонистические свойства бактерий *Bacillus velezensis* // Живые системы-2019. Саратов, 2019. С. 171–173.
- Коннова С. А. Микробные гликополимеры в растительно-бактериальных взаимодействиях на модели свободноживущих ризобактерий рода *Azospirillum* : материалы V Всероссийской конференции молодых ученых // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой. Саратов, 2010. С. 11.
- Петерсон А. М., Чиров П. А. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2005. 24 с.
- Умаров М. М., Кураков А. В., Степанов А. Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. М. : ГЕОС, 2007. 137 с.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУР CRISPR-CAS СИСТЕМ В ГЕНОМАХ ТРЕХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ИХ РОЛЬ В ЗАЩИТЕ ОТ БАКТЕРИОФАГОВ

А. Ю. Борисенко¹, Ю. П. Джигоев¹, Л. А. Степаненко¹,
Н. П. Перетолчина¹, Н. А. Арефьева², Г. А. Тетерина²,
Я. А. Портная³, О. Г. Карноухова¹, Е. В. Симонова¹, Е. Б. Ракова¹,
В. П. Саловарова², И. Ж. Семинский¹, В. И. Злобин¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск
e-mail: 89500720225@mail.ru

²Иркутский государственный университет, Иркутск

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

Введение. Непомерное использование антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве способствовало к возникновению «супербактерий». Устойчивые к антибиотикам группа ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter*) представляют собой глобальную угрозу для здоровья человека. Приобретение патогенами генов устойчивости к противомикробным препаратам сократило возможности лечения инфекций, увеличило бремя болезни и повысило уровень смертности. Данная проблема требует скоординированных ответных мер и стимулировала интерес к разработке новых методов лечения [De Oliveira et al., 2020; Santajit et al., 2016]. В связи с этим предлагается вновь использовать фаговую терапию на основе CRISPR/Cas технологии с привлечением биоинформационных методов анализа [Борисенко и др., 2018].

Цель. Разработка биоинформационных программных алгоритмов поиска и анализа структур CRISPR/Cas-систем в геномах штаммов *S. aureus* и сравнительная оценка их разнообразия.

Материалы и методы. Были использованы геномы штаммов *S. aureus*: *S. aureus* AR_0470 (№ CP029653), *S. aureus* AR_0472 (№ CP029649), *S. aureus* AR_0473 (№ CP029681) из баз данных GenBank NCBI. Разработанный программный алгоритм для выявления cas-генов (MacSyFinder, ver. 1.0.2 и CRISPI: a CRISPR Interactive database), CRISPR-кассет, протоспейсеров фагов и плазмид (CRISPR R Tool; CRISPI: a CRISPR Interactive database; CRISPRFinder; CRISPRDetect).

Результаты. Используя биоинформационный алгоритм в геномах 3 штаммов *S. aureus* были выявлены гены CRISPR-систем типа III-A, включающие cas1, cas2, cas10, csm2, csm3, csm4, csm5, csm 6,

cas6, так и cas-гены, характерные для I-B типа: cas8b1 и cmr7 (рис.). Были выявлены две кассеты. Анализ спейсеров в CRISPR-кассетах позволил осуществить идентификацию фагов, комплементарно соответствующих последовательностям протоспейсеров фагов, специфичных для бактериофагов рода *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*.

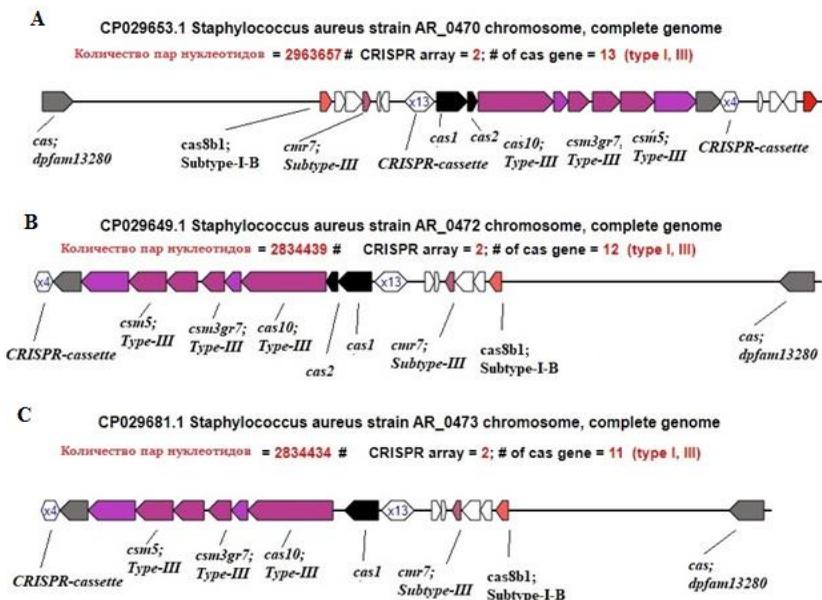


Рис. Позиции локусов и структуры CRISPR систем в геномах трех штаммов *S. aureus*. А) *S. aureus* AR_0470; Б) *S. aureus* AR_0472; В) *S. aureus* AR_0473

Заключение. Результаты разработанного программного алгоритма показали его перспективность для поиска и анализа структур CRISPR-Cas-систем и их функционирования в других патогенных бактериях. Уникальное строение выявленных CRISPR-систем в штаммах *S. aureus*, свидетельствует о разнообразии как cas-генов, так и CRISPR-кассет, входящих в состав генома. Дальнейшее применение алгоритма для изучения локусов CRISPR способствует разработке персонафицированной фаговой терапии заболеваний вызванных *S. aureus*, так и другими патогенными бактериями.

Литература

Борисенко А. Ю., Джиоев Ю. П., Перетолчина Н. П., Степаненко Л. А., и др. Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR/Cas-систем в геноме штамма *Staphylococcus aureus* и оценка профилей фаговых рас, детектируемых через CRISPR-каскаду бактерий // *Acta Biomedica Scientifica*. 2018. Т. 3, № 5. С. 49–53.

De Oliveira D. M. P., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N. A., Schembri M. A., Beatson S. A., Paterson D. L., Walker M. J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens // *Clin Microbiol Rev*. 2020. Vol. 33(3): e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens // *Biomed Res Int*. 2016. Vol. 2016(2). P. 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА КОМАРОВ-ПЕРЕНОСЧИКОВ ДИРОФИЛЯРИЙ

В. А. Бурлак, В. С. Федорова, К. М. Кириленко
Р. С. Воробьев, А. А. Коханенко, Г. Н. Артемов

Томский государственный университет, Томск, e-mail: flywings@mail.ru,
glebartemov@mail.tsu.ru

Изучали микрофлору кишечника самок малярийных комаров *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae) популяции с. Коларово (Томская область) на различных фазах паразитирования микрофилярий трансмиссивного гетероксенного биогельминта, нематоды *Dirofilaria repens* (Spirurida, Onchocercidae). Контролем служили свободные от заражения голодные и сытые самки. Исследование проводилось с помощью высокопроизводительного нанопорового секвенирования генов 16S рРНК микробиома кишечника самок малярийных комаров на приборе MinION (Oxford Nanopore, Великобритания). Результаты компьютерного анализа полученных последовательностей сравнивались с архивами GenBank для определения видового состава микроорганизмов.

Нематода *D. repens* – возбудитель офтальмо- и подкожного диروفилариоза, заболевания человека, псовых и кошачьих, серьезная медицинская и ветеринарная проблема последних десятилетий. Паразит быстро продвигается из высоко эндемичных территорий (Средиземноморье, Кавказ) на север и восток, адаптируясь к местным условиям в эктотермных промежуточных хозяевах – кровососущих комарах. С экспансией диروفиларий на север возрастает значимость малярийных комаров как переносчиков паразита по сравнению с другими видами кровососущих комаров. Северная граница ареала диروفиларий в настоящее время соответствует 62–63° с. ш. Микрофлора комаров – основной биотический фактор, определяющий агрессивность среды

I порядка для паразита. Изучение стратегий и механизмов адаптации диروفиларий послужило поводом для настоящего исследования.

Для сравнения отобрали по одной самке зараженных комаров: середина возраста L1 микрофилярий (стадия «сосиски»), начало-середина возраста L2, а также L3 (инвазивная стадия микрофилярии). Три выбранные фазы заражения характеризуются началом, кульминацией и разрешением гельминто-гостального конфликта, когда формируется специфическая по составу и порядку доминирования видов микробиота.

Первый этап, максимально стрессовый для хозяина, характеризовался небольшим снижением разнообразия микроорганизмов по сравнению с «голодным» контролем на уровне рода (на 19,1 %) и вида (на 13,1 %), а также существенной сменой состава микробиоты: индекс Жаккара (ИЖ) 0,233. Анализ доминирующей группы (> 1 %) показал, что из девяти видов «голодного» контроля (*Alcaligenes aquatilis*, *Castellaniella defragrans*, *Paenalcaligenes suwonensis*, *Paracandidimonas soli*, *Pelistega europaeae*, *Pigmentiphaga daeguensis*, *Pusillimonas noertemanni*, *Thorsellia anophelis*, *Verticiella sediminum*), остался один (*Th. anophelis*), доля которого возросла от 14,8 до 95,0 %, что, по всей видимости, стало следствием сильного физиологического стресса хозяина. К этому моменту от инвазии погибает от 20 до 60 % самок, в зависимости от концентрации микрофилярий в крови дефинитивного хозяина.

Второй этап, кульминация гельминто-гостального конфликта, проявляется относительным равновесием системы «паразит-хозяин», а также формированием среды I порядка при помощи ассоциированной микрофлоры паразита. Разнообразие микробиоты достигло максимума: число родов возросло в 2,34 раза по сравнению с «голодным» контролем (ИЖ 0,258), в 2,89 раза по сравнению с первым этапом (ИЖ 0,259) и в 1,89 раза по сравнению с «сытым» контролем (ИЖ 0,354). Число видов увеличилось в 3,75 (ИЖ 0,152), 4,32 (ИЖ 0,169) и 2,45 (ИЖ 0,273) раза соответственно. Также возможны другие источники пополнения разнообразия: минорная компонента микробиома хозяина в концентрациях ниже чувствительности метода, основное (гематофагия) и дополнительное (нектарофагия) питание самок, успевающих пройти к этому моменту 2-4 гонотрофического цикла. Не исключено, что негативные сигналы внутренней среды провоцируют самок пополнять запас микробиоты в определенных местах (водоемы, сок растений) для восстановления и поддержания физиологического гомеостаза. Доминирующая группа микроорганизмов близка к «сытому» контролю: совпадение выявлено по 10 видам бактерий (ИЖ 0,625), связанных с утилизацией крови и ее продуктов (*Aeromonas*

cavia, *A. enteropelogenes*, *A. hydrophila*, *Agrobacterium fabrum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Lonsdalea populi*, *L. quercinia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Variovorax ginsengisoli*, *V. paradoxus*).

Третий этап отношений «паразит-хозяин», когда вызревшие микрофилярии готовы покинуть промежуточного хозяина, характеризовался снижением разнообразия микробиоты на около 10 % до уровня «сытого» контроля, а также устоявшимся равновесием, когда паразит успешно завершает развитие, а хозяин переходит из категории компетентного в разряд эффективного вектора. В доминирующей группе сохранилось шесть видов из десяти, отмеченных для «кульминационного» этапа, но при этом появилось семь видов риккетсий (*Rickettsia belli*, *R. buchneri*, *R. conorii*, *R. heilongjiangensis*, *R. japonica* УН, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*). Еще шесть видов риккетсий встретились с частотой от 0,1 до 1 %. Всего для этапа отмечено 27 видов риккетсий (72 % общего объема микробиоты), включая возбудителей эпидемического сыпного тифа (*R. prowazekii*), сибирского клещевого риккетсиоза (*R. sibirica*) и пятнистой лихорадки Скалистых гор (*R. rickettsii*). По всей видимости, часть сформированной под влиянием диروفиларий микробиоты попадает со слюной комара в организм дефинитивного хозяина, подавляя его иммунитет и облегчая нематодам переход в новую среду. По видам (ИЖ 0,395) и родам (ИЖ 0,464) инфективные и сытые самки проявили максимальное сходство в пределах исследования.

Сравнение интактной и инвазированной части эксперимента выявило 1362 общих вида микроорганизмов (36,3 %), оригинальная микрофлора для контролей — 379 видов (10,1 %), для инвазии — 2013 видов (53,6 %). Неизменная часть микробиома во всех вариантах эксперимента составила 138 видов (от 4,6 до 20,1 % на вариант). Эти виды относятся к симбионтам первой очереди, и, возможно, представляют часть холобиома (для окончательного подтверждения необходимы сведения по микробиому личинок комаров). Полученные данные свидетельствуют, что микробиом комаров имеет высокую реактивность и чувствительность в зависимости от степени, качества и направленности воздействия фактора на организм хозяина.

В исследовании выявлено значительное число патогенов и условных патогенов человека: *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, *Orientia tsutsugamushi*, *Bartonella bacilliformis*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. clarridgea*, *B. vinsonii ssp. arupensis*, *Brucella ovis*, *B. microti*, *Klebsiella michiganensis*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *Raoultella ornithinolytica*, *R. planticola*, *R. terrigena*, *Salmonella enterica*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. sicca*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Serratia marcescens, *Spiroplasma mirium*, *Shigella dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei*, *Sphingomonas mucosissima*, *S. paucimobilis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. pestis* и др. Большая их часть характерна для второй-третьей стадии паразитирования микрофилярий, что подтверждает концепцию сапронозов и заставляет внимательнее отнестись не только к конечной стадии паразитирования диروفиллярий, но и к ее промежуточным этапам.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10040).

ЭКСТРАКТ КОРЫ ДУБА (*QUERCUS CORTEX*) СНИЖАЕТ ВИРУЛЕНТНОСТЬ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* ЧЕРЕЗ QUORUM SENSING-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ

А. С. Васильченко¹, Д. В. Пошвина¹, Р. Сидоров²
А. В. Яшников¹, Е. А. Рогожин³, А. В. Васильченко¹

¹Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО) Тюменского государственного университета, Тюмень, e-mail: avasilchenko@gmail.com

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

³Институт биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова РАН, Москва

Актуальность. *Pectobacterium carotovorum* – это грамотрицательная бактерия, повсеместно распространенная на Земле. Способность продуцировать ряд ферментов, разрушающих клеточную стенку растений [Pöllumaa et al., 2012], определяет присутствие этого вида в списке топ-10 фитопатогенных микроорганизмов [Mansfield et al., 2012]. Производство ферментов, разрушающих клеточную стенку растений, запускается плотностно-зависимой межклеточной коммуникацией – феномен quorum sensing (QS, англ. «чувство кворума»), открытие которого позволило по-другому взглянуть на функционирование микробных сообществ, в том числе на то, как реализуется патогенный потенциал бактериальной популяции. Диссоциация межклеточной коммуникации может оказаться многообещающим подходом к борьбе с болезнями растений [Ji et al., 2014]. Ранее подавляющие эффекты экстрактов, полученных из тканей *Quercus virginiana* Mill (Fagaceae) [Adonizio et al., 2021] и *Quercus robur* [Tolmacheva et al., 2014], были показаны в отношении QS *Chromobacterium violaceum*.

Цель – исследовать механизм антивирулентного действия экстракта из коры дуба и перспективность его использования в защите растений от бактериозов.

Результаты. Эта работа основана на существующих исследованиях, в которых были обнаружены ингибиторы QS, продуцируемые дубом (*Quercus* sp.) [Deryabin, Tolmacheva, 2015]. Установлено, что совместная инкубация *Pectobacterium carotovorum* ВКМ-Б-1247 с экстрактом коры дуба (ЭКД) снижает продукцию ацилированных гомосерин лактонов – QS-индукторов (ацил-ГЛС). Это сопровождается дозозависимым снижением целлюлозолитической и протеазной активности бактерий. Эффект ЭКД на транскриптном уровне заключается в подавлении экспрессии основных связанных с QS генов *expR/expI*.

В опыте *in vivo* клубни картофеля, предварительно обработанные ЭКД, показали устойчивость к проявлению симптомов мягкой гнили при заражении пектобактериями (рис.). ГХ-МС анализ компонентного состава ЭКД позволил выявить несколько биологически активных молекул, таких как н-гексадекановая кислота, 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол, бутилгидрокситолуол (БГТ), гамма-ситостерол, лупеол и другие. Проведенный молекулярный докинг с расчетом энергии связывания идентифицированных молекул с гомологичными моделями рецепторных белков типа LuxR-LuxI, показал высокий потенциал связывания некоторых идентифицированных растительных молекул с этими белками.

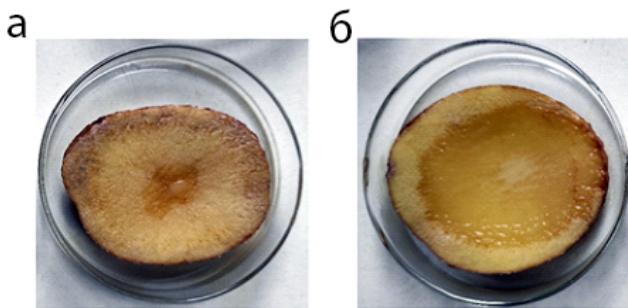


Рис. Ингибирование вирулентности *P. carotovorum* ВКМ-Б-1247.

Картофельные доли перед инокуляцией *P. carotovorum* (10^6 КОЕ/мл) обрабатывались экстрактом коры дуба (1 мг/мл). Репрезентативные фотографии развития симптомов мягкой гнили на необработанных (б) и предварительно обработанных (а) образцах картофеля. Фотографии сделаны через 48 ч после заражения

Литература

- Adonizio A. L., Downum K., Bennett B. C., Mathee K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida // *J. Ethnopharmacol.* 2006. Vol. 105. P. 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.025>
- Deryabin D. G., Tolmacheva A. A. Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract // *Molecules.* 2015. Vol. 20. P. 17093–17108. <https://doi.org/10.3390/molecules200917093>
- Ji Hee Han, Diby Paul, Se Weon Lee, Jin Woo Park, Kyung Seok Park. Aqueous plant extracts as possible quorum sensing inhibitory (QSI) agents against soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* in tobacco // *Pure Appl Microbiol.* 2014. Vol. 8, N 1. P. 63–68.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V., Machado M. A., Toth I., Salmond G., Foster G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology // *Molecular Plant Pathology.* 2012. Vol. 13. P. 614–629.
- Pöllumaa L., Alamäe T., Mäe A. Quorum sensing and expression of virulence in *pectobacteria* // *Sensors (Basel).* 2012. Vol. 12, N 3. P. 3327–3349. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Tolmacheva A. A., Rogozhin E. A., Deryabin D. G. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants // *Acta Pharmaceutica.* 2014. Vol. 64, N 2. P. 173–186. <https://doi.org/10.2478/acph-2014-0019>

МИКРОБНЫЕ ОБРАСТАНИЯ КАРСТОВЫХ ПЕЩЕР: АДАПТАЦИЯ К ОЛИГОТРОФНЫМ АФОТИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ

Н. Е. Гоголева^{1,2,3}, А. С. Балкин³, О. Я. Червяцова⁴
Л. Ю. Кузьмина⁵, Е. И. Шагимарданова², Ю. В. Гоголев^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань
e-mail: negogoleva@gmail.com

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

⁴Государственный природный биосферный заповедник «Шульган-Таш»

⁵Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Уфа

Пещеры представляют собой биотопы, для которых характерны стабильные низкие температуры, повышенная влажность, скудность органических субстратов, отсутствие освещения. Невозможность производства органического вещества фототрофными организмами компенсируется богатством окислительно-восстановительных процессов у хемоавтотрофных и хемолитоавтотрофных бактерий и архей. Типичными членами сообщества являются актиномицеты, среди которых часто обнаруживаются продуценты антибиотиков и которые могут служить источниками ценных ферментов для биотехнологии. Нами были исследованы микробные обрастания в карстовой пещере Шульган-Таш (Башкортостан), признанной объектом культурно-ис-

торического наследия. Субстраты этой пещеры весьма бедны углеродом и азотом из-за отсутствия каналов, соединяющихся с эпикарстом и почвой. Олиготрофные условия препятствуют развитию гетеротрофных микроорганизмов, что дает преимущество хемолитотрофам. Таксономическое профилирование было выполнено на основании секвенирования V4 переменного участка гена 16S рРНК и дополнено данными сканирующей электронной микроскопии и морфологической характеристики. Большую часть сообществ представляли бактерии, образующие биопленки. В них преобладали представители филумов *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* и *Chloroflexi*. Значительную часть микробиома составляли организмы, не классифицированные до рода. Преобладание актинобактерий отмечалось ранее в схожих по структуре и морфологии биопленках карстовых пещер Европы, а также вулканических пещер Гавайев и Гвинеи. При этом в большинстве изученных биопленок также доминировали неклассифицированные до рода представители семейства *Pseudonocardiaceae*. Оценка влияния экологических факторов показала, что развитие актинобактерий приурочено к ближним частям пещеры, находящимся в большей зависимости от климата на поверхности. Из архей были обнаружены представители филума *Thaumarchaeota*, *Nanoarchaeaeota*, *Euryarchaeota*, среди которых доминировали *Thaumarchaeota* (>60 %). Функциональное профилирование микробиома пещеры Шульган-Таш с помощью программы PIC-RUS2 выявило его высокий потенциал фиксации CO₂, участие в окислении метана, азота и серы. При этом азотный цикл, вероятно, охватывает несколько энергетических путей, включая нитрификацию, восстановление нитратов и денитрификацию.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Микробиологическая часть работы выполнена в рамках госзадания ФИЦ КазНЦ РАН.

АДАПТАЦИЯ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ В РАСТИТЕЛЬНОМ ОРГАНИЗМЕ

А. С. Дымнич, М. Г. Белова, А. В. Яшина, Е. В. Глинская

Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, e-mail: dymnich_as@mail.ru

Ассоциативные микроорганизмы злаковых культур представлены значительным количеством видов бактерий и грибов [Глинская, 2019]. С растений озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paoletti, 1753) сорта «Калач 60» и озимой ржи (*Secale cereale* L., 1753) сорта «Марусенька» нами ранее были изолированы доминантные виды ассоциативных микроорганизмов [Глинская, 2019; Неамах, 2019]. Исследуемые сорта ржи и пшеницы являются районированными высокопродуктивными сортами, широко возделываемыми на территории Саратовской области и Поволжья [Прянишников, 2018].

Ассоциативные взаимодействия бактерий и растений представляют взаимное положительное влияние партнеров, связанное с их взаимоотношениями на молекулярном уровне [Стадник, 2001].

Адаптивный потенциал микроорганизмов к условиям обитания можно оценить по диапазону ферментативной активности микроорганизмов и устойчивости к различным факторам окружающей среды [Sadia, 2020; Somova, 2017].

В связи с вышеизложенным, целью работы являлось изучение способности ассоциативных бактерий ржи и пшеницы к гидролизу растительных биомолекул и росту при различных факторах внешней среды (температура, pH среды, концентрация NaCl). В качестве объектов исследования были выбраны доминантные виды бактерий, входящие в состав микробных ассоциаций злаковых культур: *Bacillus horikoshii*, *B. oleronius*, *E. carotovora*, *E. uredovora*, *Staphylococcus xylosus*. Микроорганизмы были изолированы с поверхности растений, из внутренней среды и прикорневой почвы на разных стадиях развития злаков [Неамах, 2019].

Липиды, как сложная смесь нерастворимых в воде жиров и жироподобных веществ, содержатся в злаковых растениях в среднем от 2 до 3 % (от массы всего растения), причем в основном концентрируются в зернах, но и там они распределяются неравномерно. В зернах пшеницы, к примеру, наиболее богатыми считаются зародыш (12–

15 % липидов (от массы зерна) и алейроновый слой (9–11 %). В эндосперме липидов мало, 0,8–1 %, а в оболочках их совсем нет. По составу и строению выделяют простые липиды и сложные. Простые липиды находятся в зародыше и служат запасными веществами, которые используются при прорастании. Сложные липиды (комплекс липидов с белками, углеводами или фосфорной кислотой) входят в состав мембран оболочек клеток и клеточных структур, принимают участие в клеточных процессах. Основной фосфолипид – лецитин. В целом липиды имеют ненасыщенный характер, преобладают линолевая (32–72 % общего количества кислот) и олеиновая (10–65 %) кислоты [Прянишников, 2018].

Липиды служат источником ценных эссенциальных жирных кислот, но одновременно способны быстро окисляться. В состав кунжутного масла входит много полиненасыщенных жирных кислот (в том числе: 37–48 % линолевой, 35–48 % олеиновой, 7–8 % пальмитиновой, 4–6 % стеариновой, до 1 % арахидиновой, и др.). По жирнокислотному составу оливковое масло представляет собой смесь триглицеридов жирных кислот с очень высоким содержанием эфиров олеиновой кислоты (до 50 %). Содержание жирных кислот в подсолнечном масле составляет: линолевая 46–62 %, олеиновая 24–40 %, пальмитиновая 4–6 %, стеариновая 2–5 %, линоленовая до 1 %, и др. Из полиненасыщенных жирных кислот в подсолнечном масле содержится 1 % кислот «омега-3», и преобладают Омега-6-ненасыщенные жирные кислоты [Зиновенко, 2015].

Для оценки липолитической активности ассоциативных бактерий оценивали их способность к расщеплению таких растительных масел, как кунжутное, оливковое, подсолнечное. Наиболее активным оказался вид *Bacillus oleronius*. На 7-е сутки культивирования диаметр зон гидролиза составил: с кунжутным – 4 мм, с оливковым – 7 мм, с подсолнечным маслом – 4 мм. Вид *Staphylococcus xylosus* активно рос и использовал в среде кунжутное и подсолнечное масло (7 и 5 мм на 7-е сутки соответственно). Остальные исследуемые виды использовали только одно из четырех видов масел и достаточно медленно включали эти вещества в свои метаболические реакции, диаметр зон гидролиза не превышал 3–6 мм на 7-е сут. культивирования.

Для оценки способности ассоциативных бактерий к гидролизу полисахаридов исследуемые штаммы культивировали в средах с добавлением целлюлозы, крахмала и пектина. *Bacillus horikoshii* расщеплял целлюлозу и крахмал, *Staphylococcus xylosus* обладал амилолитической и пектинолитической активностью. Виды *Bacillus oleronius* и *Erwinia carotovora* были способны к гидролизу крахмала.

Исследование способности выделенных штаммов к использованию моно- и дисахаров в качестве источника углеродного питания показало, что они активно расщепляли глюкозу и сахарозу, которые входят в состав растительного сока злаков злаков (около 0,7 % на 100 г зерна) [Зиновенко, 2015].

Ассоциативные бактерии способны к росту в среде в диапазоне рН от 5 до 10 и при концентрации NaCl от 2 до 7 %.

К низким и высоким значениям температурного фактора (10 и 43 °С) ассоциативные бактерии не устойчивы, при понижении температуры наблюдался медленный слабый рост штаммов, при повышении температуры рост отсутствовал.

Таким образом, проявляя различную устойчивость к физическим и химическим факторам окружающей среды, микроорганизмы-ассоцианты злаковых культур способны адаптироваться к условиям обитания в растительном организме.

Литература

Глинская Е. В., Дымнич А. С., Немах А. Н. Ассоциативные микроорганизмы растений ржи и пшеницы сортов Саратовской селекции // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего». Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2019. С. 121.

Зиновенко А. Л. Химический состав и питательность зерносемена злаковых культур // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. 2015. № 18(1). С. 268–275.

Немах А. А., Глинская Е. В., Дымнич А. С. Микробные ассоциации злаковых культур // Материалы Международной научной конференции, посвященной 110-летию СГУ имени Н. Г. Чернышевского «Живые системы». Саратов : Амрит, 2019. С. 160–161.

Прянишников А. И. Научные основы адаптивной селекции в Поволжье. М. : РАН, 2018. 96 с.

Стадник Г. И., Калашникова Е. Е., Коннова С. А., Игнатов В. В. Роль поверхностных и внеклеточных соединений бактерий *Xanthomonas campestris* в патогенных взаимоотношениях с растениями капусты // Микробиология. 2001. Т. 70, № 2. С. 270–274.

Sadia Latif et al. Characterization of bacterial community structure in the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. // Genomics. 2020. Vol. 112, Iss. 6. P 4760–4768.

Somova L. A., Mikheeva G. A., Pechurkin N. S. Introduction of microbiocenosis in agroecosystem for increasing the plant productivity // Журнал СФУ. Биология. 2017. № 3. С. 333–342.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ В ОЧАГЕ ЭПИЗООТИИ С ВЫСОКОЙ СМЕРТНОСТЬЮ СРЕДИ ТУПИКОВ-НОСОРОГОВ (*CERORHINCA MONOCERATA*) НА ЮГЕ ПРИМОРСКОГО КРАЯ В ИЮЛЕ 2021 Г.

М. Н. Дунаева^{1,2,3}, Д. В. Панкратов², А. Л. Суrowsый⁴, В. Ю. Цыганков³, П. В. Фоменко⁵, М. Ю. Щелканов^{1,2,3,6}, М. А. Беланов³

¹Федеральный научный центр биологического разнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток

³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

⁴Управление по охране объектов животного мира и особо охраняемых природных территорий, Правительство Приморского края, Владивосток

⁵Амурский филиал Всемирного Фонда дикой природы, г. Владивосток

⁶Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток

Введение. 13 июля 2021 г. на побережье Японского моря на юге Хасанского района Приморского края была зафиксирована массовая гибель тупиков-носорогов (*Cerorhinca monocerata*). По данным департамента лесного и охотничьего хозяйства Приморского края, в пе-

риод 13–17.07.2021 было выявлено более 1000 погибших особей (*Sterna* sp.). Вскрытие животных и анализ экологической обстановки не позволили установить причину падежа: лек (*Larus* sp.) и крачек

Цель работы. Охарактеризовать микробиом погибших птиц и определить возможный этиологический агент эпизоотии.

Материалы и методы. В лабораторию были доставлены с сохранением холодовой цепочки (4 °С) 31 тушка погибших тупиков-носорогов, у которых были отобраны клоакальные смывы и пулы внутренних органов (мозг, печень, селезенка, сгусток крови). Клоакальные смывы исследовали на наличие вирусов методом инокуляции в 9-дневные куриные эмбрионы, пулы внутренних органов – методом NGS. Микробиологическое исследование клоакальных смывов проводили путем высева на дифференциальные культуральные среды: кровяной агар, мясо-пептонный агар, Эндо, Сабуро, Чапека. Сформировавшиеся в течение суток колонии были проанализированы методом масс-спектрометрии на анализаторе MALDI Biotyper (Bruker, Германия). Патогенетическое типирование *Escherichia coli* осуществляли с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс Эшерихиозы-FL» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Результаты. При первичном осмотре погибших птиц вокруг анальных отверстий были обнаружены остатки жидких и кашицеобразных испражнений. Кишечник полностью опорожнен с отсутствием остатков пищи. Гельминты не обнаружены. Кровь в крупных кровеносных сосудах по всей их длине в виде плотных сгустков.

Гемагглютинирующие агенты в хорион-аллантаической жидкости инокулированных куриных эмбрионов выявлены не были. С помощью NGS в 10 (32,3 %) пробах обнаружен цирковирус гусей (GoCV – Goose circovirus) (Cirlivirales: Circoviridae, *Circovirus*). Цирковирусы птиц вызывают снижением иммунитета, нарушение кожных покровов, оперения, клюва, когтей, и не описаны в качестве причины массовой гибели хозяев. Поэтому GoCV можно исключить из списка возможных этиологических агентов массового падежа тупиков-носорогов.

Микробиологический анализ показал наличие потенциально патогенной *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. penneri*, *P. mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Wickerhamomyces anomalus*. ПЦР-типирование выявило принадлежность *E. coli* к энтеропатогенному типу. Авиопатогенные варианты эшерихий способны вызывать острое воспалительное заболевание внутрибрюшинных органов, сопровождающееся массовой гибелью птиц. Грамотрицательные бактерии из сем. *Enterobacteriaceae* – *P. vulgaris*, *P. penneri* и *P. mirabilis* – являются причиной гнойно-воспалительных заболеваний и пищевых токсикоинфекций вследствие продукции эндотоксинов с гемолитическими свойствами. *W. anomalus* (= *Candida pelliculosa*) – широко распространенный в дикой природе грибковый патоген, способный вызывать системные грибковые заболевания при явлениях иммуносупрессии.

Следует отметить, что данная эпизоотия затронула главным образом тупиков-носорогов, что, вероятно, связано с особенностями их пищевого поведения и требует дальнейшего эколого-зоологического изучения.

Заключение. Причиной эпизоотии стала инфекция энтеропатогенного варианта *E. coli* совместно с *P. vulgaris*, *P. penneri* и *P. mirabilis*, осложненная GoCV и *W. anomalus*.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ В ФОРМАТЕ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ДИАБЕТА: ВОПРОСЫ ПРИЖИВАЕМОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Е. С. Жгун¹, Е. И. Олехнович¹, Е. В. Покровская²
Е. А. Шестакова², И. В. Федюшкина¹, Д. Конанов¹
М. В. Шестакова² Е. Н. Ильина¹

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
ФМБА России, Москва, e-mail: al.androva@gmail.com

²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии
Минздрава России, Москва, e-mail: nmic.endo@endocrincentr.ru

К настоящему времени заболеваемость ожирением и сахарным диабетом II типа достигли масштабов эпидемии и являются одной из пяти основных причин смертности в мире. Эпидемиологические исследования показывают, что более 2,1 миллиарда человек в мире имеют избыточный вес или ожирение и если тенденция не изменится, то к 2030 г. 38 % взрослого населения мира будет иметь избыточный вес, и еще 20 % будут страдать ожирением [Smiht, 2016].

Точных механизмов, посредством которых ожирение приводит к устойчивости к инсулину, до сих пор до конца не установлено. Наряду с генетическими факторами и чрезмерным потреблением калорий, одним из критичных регуляторов метаболизма является кишечная микробиота. Накопленные данные свидетельствуют о связи между нарушением регуляции кишечного микробиома и ожирением, нарушением гликемического контроля и, следовательно, патофизиологией сахарного диабета II типа [Audin, 2018].

К настоящему времени проведено несколько исследований по полногеномному секвенированию микробиоты пациентов с ожирением и сахарным диабетом II типа, которые показали, что эти патологии характеризуются достаточно умеренным дисбиозом с общим уменьшением численности бактерий-производителей бутирата, и увеличением оппортунистических патогенов [Gerard, 2019]. Метагеномные исследования выявили специфические изменения микробиоты кишечника у пациентов с метаболическим синдромом, касающиеся главным образом *Prevotella copri* и *Bacteroides vulgatus*, способствующих развитию устойчивости к инсулину, а также *Akkermansia muciphila* и *Faecalibacterium prausnitzii*, ассоциированных, в свою очередь, с повышенной чувствительностью к инсулину [de Groot, 2017].

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что коррекция микрофлоры пациентов с помощью микрофлоры здоровых доноров (трансплантация фекальной микробиоты, ТФМ) может быть

эффективна в лечении метаболических расстройств, в том числе диабета II типа. Процедура ТФМ заключается во введении в организм пациента микробиоты, полученной от здорового донора. В результате происходит колонизация кишечника донорской микробиотой, и восстановление нормальной микрофлоры кишечника [Vakken, 2011]. Процедура официально одобрена FDA для лечения резистентной формы *Clostridium difficile* [FDA, 2013].

Применение ТФМ для коррекции метаболических расстройств перспективно, однако данные о ее использовании ограничены и имеют противоречивые результаты.

В нашей работе двум пациентам (родным братьям) с ожирением II степени и различными типами сахарного диабета (СД): старший брат (44 года) с сахарным диабетом 2 типа (СД 2), младший брат (39 лет) с сахарным диабетом 1 типа (СД 1) была проведена ТФМ в составе комплексной противодиабетической терапии.

У обоих пациентов в ходе лечения отмечено снижение массы тела (динамика – 4–5 кг за первый месяц наблюдения, далее – 1–2 кг в месяц). Через 1 год после ТФМ у пациента с СД 2 отмечено снижение выраженности инсулинорезистентности (ИР), измеренной методом гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста, в то время как у пациента с СД 1 значимого уменьшения ИР за время наблюдения выявлено не было.

Метагеномное секвенирование образцов кала ($n = 20$), собранных до и в течение 1 года после проведения ТФМ проводили на геномном анализаторе HiSeq2500 (Illumina Inc., США). При помощи биоинформатического инструмента MetaPhlan были получены профили представленности микробных таксонов в исследуемых образцах.

Секвенирование образцов кала дало $6,5 \pm 3,6$ млн парных препроцессированных прочтений длиной 250 п.н. на образец. Были идентифицированы 98 видов, относящихся к 55 родам, 27 семействам во всех секвенированных метагеномах пациентов. Наиболее представленными семействами были: *Bacteroidaceae* ($22,5 \pm 15,4$ %), *Lachnospiraceae* ($19,3 \pm 10,1$ %), *Ruminococcaceae* ($17,4 \pm 6,8$ %). Нельзя не отметить, что представители семейства *Bifidobacteriaceae* практически отсутствовали как у донора, так и у пациента с СД 1, но были представлены пациента с СД 2.

Показатель альфа-разнообразия, описывающий богатство микробного сообщества, в целом продемонстрировал хаотичное поведение и не коррелировал с изменениями клинических показателей пациентов, хотя для пациента с СД 1 демонстрировал стабильность в исследуемых временных точках, а для пациента с СД 2 показал большую изменчивость.

Оценка влияния донорской микрофлоры на метагеномные профили пациентов, выполненная с помощью неметрического множественного шкалирования с использованием расстояния Брея-Кертиса не показала достоверных сдвигов микробиоты обоих пациентов в сторону донорской.

Таким образом, ТФМ не повлияла на течение заболевания у брата с СД1, но способствовала снижению массы тела и улучшению показателей гликемии при уменьшении дозы антидиабетических препаратов у брата с СД 2. Различные клинические эффекты ТФМ у пациентов могут быть связаны с различной природой заболеваний, а также длительностью с момента манифестации заболевания.

Литература

Aydin Ö., Nieuwdorp M., Gerdes V. The gut microbiome as a target for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* // 2018. Vol. 18. P. 55.

Bakken J. S., Borody T., Brandt L. J., Brill J. V., Demarco D. C., Franzos M. A., Kelly C., Khoruts A. T., Lawrence P. Martinelli L. P., Thomas A., Moore T. A., Russell G., Surawicz C. Treating *Clostridium difficile* Infection with Fecal Microbiota Transplantation // *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011. Vol. 9(12). P. 1044–1049

de Groot P. F. Frissen M. N., de Clercq N. C., Nieuwdorp. M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future // *Gut Microbes.* 2017. Vol. 8(3). P. 253–267

Fecal Microbiota for Transplantation: Scientific and Regulatory Issues 309, FDA, 2013
Gerard C., Vidal H. Impact of Gut Microbiota on Host Glycemic Control // *Frontiers in Endocrinology.* 2019. Vol. 10. P. 29.

Smith K. B., Smith M. S. Obesity statistics // *Prim Care.* 2016. Vol. 43. P. 121–135

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАСПОЗНАВАНИЯ *PECTOBACTERIUM VERSATILE* РАСТЕНИЯМИ СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫЕ

А. В. Колубако, Е. В. Шруб
О. А. Бадалян, Е. А. Николайчик

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: kolubakoav@ya.ru

Большинство имеющихся в распоряжении нашей лаборатории изолятов *Pectobacterium versatile* выделены из растений *Solanum tuberosum*, поэтому культурный картофель можно рассматривать в качестве естественного хозяина для этого вида пектобактерий. Однако *S. tuberosum* неудобен для генетических исследований по целому ряду причин. В частности, из-за устойчивости к вирусу TRV этих растений серьезно осложнено использование процедуры вирус-индуцируемого сайленсинга для быстрой инактивации генов.

Ранее мы частично охарактеризовали белок DspE *P. versatile* в качестве основного эффектора системы секреции III типа этих бактерий [Николайчик и др., 2005], однако генетический скрининг потенциальных мишеней этого эффектора был ограничен растениями табака *N. benthamiana* и томата *S. lycopersicum* из-за большего удобства этих растений для генетических манипуляций. Скрининг выявил у этих растений несколько рецепторподобных киназ, непосредственно взаимодействующих с DspE [Николайчик и др., 2012; Бадалян, Николайчик, 2014], однако роль DspE и его рецепторов во взаимодействии *P. versatile* с растениями-естественными хозяевами (*S. tuberosum*) оставалась неясной.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ реакций на контакт с *P. versatile* растений *N. benthamiana*, *S. tuberosum* и *S. bulbocastanum* – последнее является диким клубненосным диплоидным видом картофеля, пригодным для вирус-индуцируемого сайленсинга. Оценены фенотипические реакции зараженных растений и изменения экспрессии ключевых генов иммунного ответа методом кПЦР.

Инфильтрация тканей растений суспензиями клеток *P. versatile* дикого типа вызывала симптомы мягкой гнили в клубнях *S. tuberosum* и реакцию гиперчувствительности в листьях табака и *S. bulbocastanum*, тогда как инфильтрация суспензиями клеток *dspE*-мутанта приводила к менее выраженным симптомам во всех трех случаях. Тем не менее, у трех растений наблюдались существенные различия по характеру изменения экспрессии генов иммунного ответа.

Наиболее интересным оказались изменения характера экспрессии генов рецепторподобных киназ, взаимодействующих с DspE. Экспрессия исследованных генов этих RLK существенно ингибировалась патогеном у всех трех видов растений. Однако только у *N. benthamiana* эта реакция строго зависела от присутствия у патогена интактного гена *dspE*. У *S. bulbocastanum* такое ингибирование экспрессии RLK от DspE не зависело, а у *S. tuberosum* реакция зависела от сорта картофеля.

Измерение уровней экспрессии генов иммунного ответа в растениях *S. tuberosum* показало, что детекция *P. versatile* клетками тканей клубня вызывает снижение экспрессии генов биосинтеза абсцизовой кислоты *AAO3* и *NCED3* более чем на порядок, а также индукцию экспрессии гена гидроксилазы АБК, превращающей гормон в неактивную форму. В 30 раз снижается экспрессия гена конечного звена салицилатной сигнализации *PR1*, кодирующего белок с антибактериальной активностью. В 6 раз индуцирован ген негативного регулятора

жасмонатзависимых генов *JAZ3* и снижена экспрессия гена субъединицы убиквитинлигазы *COI1*, что свидетельствует о подавлении жасмонатного сигнального пути.

В листьях *S. bulbocastanum* при заражении *P. versatile* снижается экспрессия генов биосинтеза абсцизовой кислоты и повышается экспрессия гена ее гидроксилазы. Экспрессия жасмонатзависимых генов практически не меняется. Основные отличия показаны для гена *PR1*: его экспрессия не снижается, а наоборот, повышается и, с учетом повышения экспрессии гена транскрипционного фактора TGA, можно заключить, что салицилатный сигнальный путь активен и индуцируется.

В листьях растений *N. benthamiana* в ответ на внедрение *P. versatile* индуцируется ряд салицилатзависимых генов, в частности транскрипционного фактора TGA, белка, связывающего салициловую кислоту SABP2, а также *PR1*, причем использование для заражения *dspE*-мутанта снижает экспрессию этих генов до уровня раневого ответа. В отсутствие эффектора DspE перечисленные эффекты снимаются. Жасмонатная и АБК-зависимая сигнализация затронута незначительно.

Таким образом, можно констатировать принципиальные отличия в реакции трех родственных видов растений одного семейства на контакт с бактериями *P. versatile*: разнонаправленное изменение экспрессии звеньев салицилатного сигнального пути, отличия в интенсивности участия АБК-зависимой и жасмонатной сигнализации. Часть этих отличий может быть связана с использованием для исследования разных органов растений (для полноты картины мы планируем выполнить аналогичные исследования в листьях *S. tuberosum*), однако в целом очевидна достаточно тонкая регуляция взаимодействия *P. versatile* с растениями. Отличия в DspE-зависимой реакции различных сортов картофеля могут свидетельствовать о наличии у *P. versatile* как минимум еще одного эффекторного белка в дополнение к единственному известному на сегодня эффектору DspE.

Литература

Бадалян О. А., Николайчик Е. А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum* // Известия НАН Беларуси. 2014. № 4. Р. 75–79.

Николайчик Е. А. et al. Белок DspE транслоцируется фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и является необходимым для индукции реакции гиперчувствительности // Доклады НАН Беларуси. 2005. Т. 49, № 5. Р. 81–85.

Николайчик Е. А. et al. Роль рецепторподобной трансмембранной киназы растений семейства пасленовых во взаимодействии с фитопатогеном *Pectobacterium carotovorum* // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 1. Р. 112–117.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ – СИМБИОНТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Э. В. Курлюк¹, А. В. Суздальцева²

¹Пермский государственный аграрно-технологический университет им. академика

Д. Н. Прянишникова, Пермь, e-mail: Kurlyuk2012@mail.ru

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал

Пермского Федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь

e-mail: alexandra9985@yandex.ru

В настоящее время во всем мире наблюдается активизация условно-патогенных бактерий-оппортунистов, которые являются нормальными обитателями тела здорового человека. Таковыми являются и коагулазонегативные стафилококки. Стафилококки способны формировать биопленки, что позволяет им противостоять воздействию не только защитных сил организма человека, но и лекарственных средств. Антибиотики, применяемые человеком в течение жизни, оказывают селективное действие на условно-патогенную микрофлору, которая в свою очередь становится источником генов антибиотикорезистентности. В связи с ростом глобальной проблемы устойчивости бактерий к антибиотикам, необходим систематический мониторинг этого состояния для разработки стратегий эффективного лечения инфекционных заболеваний.

Целью работы явилось выделение коагулазонегативных стафилококков (КНС) с покровов тела обучающихся 3-го курса ФГБОУ ВО Пермский ГАТУ с оценкой их чувствительности к антибиотикам и способности к выделению межклеточного полисахаридного адгезина – фактора агрегации и биопленкообразования.

Выделение бактерий рода *Staphylococcus* производили из смывов кожи локтевого сгиба 14 здоровых добровольцев, заполнивших информированное согласие на участие в исследовании. Сбор материала выполнялся согласно методам санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности [МР 4.2.0220-20]. Высев из смывов проводили по типу «штриха» на селективную питательную среду – желточно-солевой агар (ЖСА). Колонии КНС, выросших на ЖСА, переносили на жидкую среду Luria Bertani для получения накопительной культуры, которые использовали для постановки дискодиффузионного теста для определения чувствительности бактерий к антибиотикам. Для исследования использовали стандартные бумажные диски с нанесенными на них клинически значимыми антибиотиками

(«НИЦФ», СПб). Тестирование бактерий КНС на способность к секреции полисахаридных межклеточных соединений проводили с использованием индикатора конго красный («Вектон») [Полудова и др., 2014].

Колонии с культурально-морфологическими признаками присущими КНС, сформировались на поверхности селективной среды ЖСА через 2–3 сут. культивирования при 37 °С в высевах из всех проб [Нежвинская и др., 2015]. Результаты диско-диффузионного метода оценки антибиотикочувствительности интерпретировали согласно методическим указаниям [МУК 4.2.1890-04]. Все исследованные бактерии были чувствительны к гентамицину, канамицину, оксациллину и рифампицину. Десять изолятов из 14 исследованных были устойчивы к бензилпенициллину (диаметр зоны подавления роста ≤ 28 мм). Два изолята обладали резистентностью к левомицетину (диаметр ≤ 12), резистентность к линкомицину (< 17) и фузидину (< 15) была выявлена для одного из 14 штаммов. Половина исследованных изолятов была устойчива к эритромицину (≤ 13). Бактерии штамма № 8 обладали промежуточной устойчивостью к ципрофлоксацину (диаметр 16–20 мм). Чувствительными ко всем исследованным антибиотикам были бактерии только трех выделенных штаммов № 7, 12 и 13 (21,4 %). Устойчивость к одному антибиотику выявлена у КНС четырех штаммов № 2, 4, 6 и 14 (28,5 %). Полирезистентными (устойчивым к 2 и более антибиотикам) были бактерии семи штаммов (50 %) (табл.).

Таблица

Диаметры зон подавления роста бактерий разных штаммов КНС вокруг дисков с антибиотиками, мм

Антибиотик \ Штамм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Бензилпенициллин (10 ед.)	12	10	10	12	0	10	38	14	0	15	40	34	46	0
Гентамицин (10 мкг)	24	32	29	26	28	30	30	28	30	23	32	24	26	27
Канамицин (30 мкг)	21	26	24	22	30	21	23	28	26	20	24	22	22	26
Левомецетин (30 мкг)	0	30	23	22	10	24	24	22	20	28	23	24	25	34
Линкомицин (15 мкг)	15	34	30	26	30	30	34	32	40	23	30	18	29	32
Оксациллин (10 мкг)	32	36	30	32	38	26	36	40	24	38	32	34	44	19
Рифампицин (5 мкг)	32	42	32	34	36	32	40	36	34	46	40	34	46	34
Фузидин (10 мкг)	28	40	26	22	40	30	40	34	26	29	14	32	29	34
Ципрофлоксацин (5 мкг)	32	35	25	30	32	26	36	16	28	30	26	29	26	37
Эритромицин (15 мкг)	9	32	10	24	0	25	28	10	10	10	0	24	27	25

Среди факторов свидетельствующих о способности стафилококков к образованию биопленок, выделяют наличие у них полисахаридного межклеточного адгезина – PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), который участвует в первой стадии прикрепления бактерий к поверхностям [Vuong et al., 2004]. Из 14 штаммов КНС, выращенных на плотной среде с индикатором конго красным, PIA-позитивный фенотип выявлен лишь у бактерий штаммов № 2 и № 13, колонии которых в заданных условиях обладали черной окраской. Колонии остальных исследованных КНС обладали бледно-розовой или красной окраской, что свидетельствовало об отсутствии PIA в межклеточном пространстве [Полюдова и др., 2014]. Следует отметить, что секреция PIA является лишь одним из множества механизмов биопленкообразования известных для стафилококков [Schilcher, Horswill, 2020].

Таким образом, показано, что бактерии рода *Staphylococcus* являются постоянными спутниками человека. Данная группа бактерий имеет высокий адаптивный потенциал к неблагоприятным факторам среды обитания, в том числе и к антибиотикам.

Литература

MP 4.2.0220-20. 4.2. Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды // КонсультантПлюс : справочная правовая система (дата обращения: 27.11.2021).

МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200038583> (дата обращения: 29.11.2021).

Нежвинская О. Е., Дудчик Н. В., Коломиец Н. Д. и др. Методы оценки эпидемиологической значимости условно-патогенной микрофлоры // Здоровье и окружающая среда. 2015. Т. 1, № 25. С. 69–71.

Полюдова Т. В., Лемкина Л. М., Коробов В. П. Анализ пленкообразующей способности клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков // ВУМАН. 2014. № 5. С. 59–63.

Schilcher K., Horswill A. R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2020. Vol. 84. V.3. <https://doi.org/10.1128/mmb.00026-19>

Vuong C., Voyich J. M., Fischer E. R., Braughton K. R., Whitney A. R., DeLeo F. R., Otto M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system // Cellular Microbiology. 2004. Vol. 6. V. 3. P. 269–275.

О СОЗДАНИИ ПРЕПАРАТА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ МАСТИТА КОРОВ

М. А. Ладанова¹, О. Б. Новикова²

¹Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Санкт-Петербург, Ломоносов, e-mail: ksuvet@mail.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины Санкт-Петербург, e-mail: ldhvmr@gmail.com

Мастит – воспаление молочной железы, имеющий широкое распространение в животноводческих хозяйствах. Ведущую роль в этиологии мастита отводят микробному фактору. С каждым годом вопросы профилактики и лечения мастита у коров становятся все более актуальными, остро стоит вопрос использования антибиотиков и развивающейся резистентности к ним. Для получения лучшего терапевтического эффекта перед началом лечения коров, больных маститом, следует выделить культуры, вызывающие воспаление молочной железы, определить их антибактериальную чувствительность и на основании полученных данных выбирать препарат. С целью изучения микрофлоры, выделяемой при маститах, мы провели исследования в 4 животноводческих хозяйствах Ленинградской области по выращиванию молочного скота. При бактериологическом исследовании молока от коров с клиническими признаками мастита различной формы были выделены около 70 культур разных видов микроорганизмов, что говорит о разнообразии микробного пейзажа. У выросших колоний изучали морфологические, культуральные, тинкториальные, биохимические, серологические и при необходимости вирулентные свойства. Среди выделенной микрофлоры доминирующими были стафилококки (в том числе гемолитические), микроорганизмы рода *Bacillus* (в том числе гемолитические), энтеробактерии (кишечная палочка, клебсиелла). Выделяли стрептококки (в том числе гемолитические), синегнойную палочку. Выявление доминирующей микрофлоры в каждом отдельном случае было разным, и зависело от эпизоотической ситуации в конкретном животноводческом хозяйстве. Во многих случаях отмечали развитие смешанных инфекций, ассоциативное воздействие разных видов микроорганизмов на организм животного.

Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом (методом дисков). Использовали диски с антибиотиками с известной концентрацией действующего вещества производства НИЦФ, НИИЭМ им. Пастера. В качестве питательной среды использовали плотную среду Мюллера-Хинтона в чашках Петри согласно

нормативным документам [МУК 4.2.1890-04, 2004; Клинические рекомендации, 2017]. При изучении чувствительности установлена резистентность многих культур к антибактериальным препаратам разных групп. Например, 50 % культур стафилококков были высокочувствительны и чувствительны и 50 % имели среднюю чувствительности или были резистентны к антибиотикам тетрациклиновой группы (доксциклин, тетрациклин), из группы аминогликозидов (стрептомицин). Хуже всех сработал препарат из группы линкозамидов линкомицин – все 9 исследованных культур стафилококков были к нему устойчивы. При определении чувствительности наилучшие результаты показали антибиотики из группы аминогликозидов (гентамицин), макролидов (азитромицин), амфениколов (левомицетин), фторхинолонов (ципрофлоксацин, энрофлоксацин), цефалоспоринов (цефтиофур) – к ним были чувствительны более 50 % исследованных культур. Возникновение микробных штаммов с новыми свойствами нередко происходит при контакте с химическими соединениями в среде, в которой микроорганизмы обычно свободно размножаются – при этом часть из них погибает, а наиболее стойкие, адаптируясь, выживают и в дальнейшем могут давать резистентные штаммы по отношению к антибиотикам.

Поэтому при применении антибиотиков с целью лечения в каждом отдельном случае необходимо проверять чувствительность культур, выделяемых в хозяйстве, к антибактериальным препаратам. При использовании антибиотиков без определения чувствительности часто развивается антибактериальная резистентность у микроорганизмов. Бессистемное лечение антибиотиками не только неэффективно, но и наносит существенный ущерб, поскольку развивается антибиотикорезистентность. Кроме того, накопленные в организме животных, а также в их продуктах антибиотики способствуют развитию аллергии и появлению антибиотикорезистентных микроорганизмов, вызывающих болезни у людей.

В связи с быстрой адаптацией микроорганизмов к применяемым антибиотикам актуален поиск нового подхода к профилактике маститов бактериальной этиологии – разработка вакцины. Для создания препарата специфической профилактики мы отобрали доминировавшие виды микроорганизмов. В качестве антигена вакцина содержит бактериальную массу *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina spp.*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*

spp. с активностью не менее 10^9 КОЕ $100/\text{см}^3$. Изготовленные опытные образцы вакцины инактивированной, сорбированной контролировали на стерильность, безвредность, реактогенность и иммуногенность. Производственные испытания были проведены на ограниченном поголовье на базе двух животноводческих хозяйств Ленинградской области. Вакцину вводили подкожно в объеме 5 см^3 в область средней трети шеи однократно. На базе животноводческого хозяйства № 1 было провакцинировано 30 коров. На протяжении первых 4 мес. не было выявлено ни одного случая мастита среди подопытной группы, в течение последующих 3 мес. было выявлено три случая мастита, один из которых в результате полученной травмы соска у коровы, у двух других – в результате переохлаждения вымени. Результатом вакцинации являлся выраженный иммунный ответ на протяжении 8 месяцев у 90 % провакцинированных коров. Во втором хозяйстве провакцинировано 20 коров. На протяжении 7 мес. заболела 1 корова. Результатом вакцинации являлся выраженный иммунный ответ на протяжении 8 мес. у 95 % провакцинированных коров.

Техническим результатом наших исследований является конструирование и получение высокоиммуногенной и ареактогенной вакцины инактивированной для профилактики мастита у крупного рогатого скота [Ladanova et al., 2022]. Данная вакцина является многокомпонентной, содержит культуры, циркулирующие в конкретном хозяйстве. В настоящее время продолжают исследования по эффективности использования данного препарата в хозяйствах Ленинградской области. Это первый шаг в разработке вакцины против мастита в Российской Федерации. Использование вакцины для профилактики мастита у крупного рогатого скота позволит снизить частоту использования антибактериальных препаратов, что положительно отразится на качестве молочной продукции.

Литература

МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М. : Федер. центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.

Клинические рекомендации: Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам : утв. на расширенном совещании Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (Москва, 15.05.2017) и экспертном совещании профильной комиссии по специальности «Клиническая микробиология и антимикробная резистентность» (г. Сочи, 18.10.2017).

Ladanova M., Dzhavadov E., Stekolnikov A., Novikova O., Plemyashov K., Nechaev A., Nikitin G. Prevention of mastitis in cows // *Reproduction in Domestic Animals*. 2022. Vol. 57. P. 115.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА МЕЛКОВОДНЫХ СТРУЙНЫХ МЕТАНОВЫХ ГАЗОВЫДЕЛЕНИЙ В ПРИБРЕЖНЫХ РАЙОНАХ КРЫМА

Т. В. Малахова¹, А. И. Мурашова¹
В. В. Лобко¹, Н. В. Пименов²

¹Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, e-mail: t.malakhova@imbr-ras.ru

²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Струйные метановые газовыделения (сипы) – широко распространенный феномен в Мировом океане, в том числе в бассейне Черного моря. Актуальность исследований метановых сипов обусловлена их важной ролью в качестве источника метана для водной толщи и атмосферы, как парникового и средообразующего газа. Экологическая роль сипов связана с их влиянием на содержание в воде растворенных газов, в том числе, растворенного кислорода. Определяющим отличием мелководных сипов Черного моря от глубоководных является окисленная среда, в которой происходят процессы газовой выделение и сопутствующие этому биогеохимические процессы. Как правило в районах газовой выделение создаются гипоксические условия в придонных слоях воды [Малахова и др., 2021], что позволяет развиваться азототолерантным или даже анаэробным микроорганизмам. При этом образуются микробиотопы, способные поддерживать и восстанавливать условия среды.

В течение многолетнего мониторинга в прибрежных районах Крыма обнаружено и описано множество отдельных газовой выделяющих площадок, которые располагались от мыса Тарханкут на западе полуострова до бухты Двужорной на юго-востоке [Малахова и др., 2020]. Преобладающая часть прибрежных сипов Крыма имела биогенную природу и сезонный характер газовой выделение, к глубинному газу термокаталитического генезиса отнесены сипы, расположенные в бухте Ласпи. В районах газовой выделение на поверхности донных отложений присутствовали бактериальные пленки, которые в зависимости от типа газовой выделение, климатических условий и сезона года имели различную степень покрытия дна, морфологическую и видовую структуру (рис.).

Наибольшую площадь покрытия имели бактериальные маты в бухте Херсонесской, которые были представлены белыми хлопьевидными пленками на поверхности сульфурет (газонасыщенных восста-

новленных песчаных или илистых отложений). По результатам электронно-микроскопических и молекулярно-биологических исследований было установлено, что основу бактериальных матов составляли нитчатые серобактерии семейства *Thiotrichaceae* и эpsilon-протеобактерии семейства *Helicobacteraceae* [Bryukhanov, 2018]. В бухте Мраморной в скальных углублениях, заполненных мелкодисперсными детритными газонасыщенными отложениями, развивались белые бактериальные маты, основу которых составляли сульфидокисляющие эpsilon-протеобактерии рода *Arcobacter* [Pimenov, 2018].

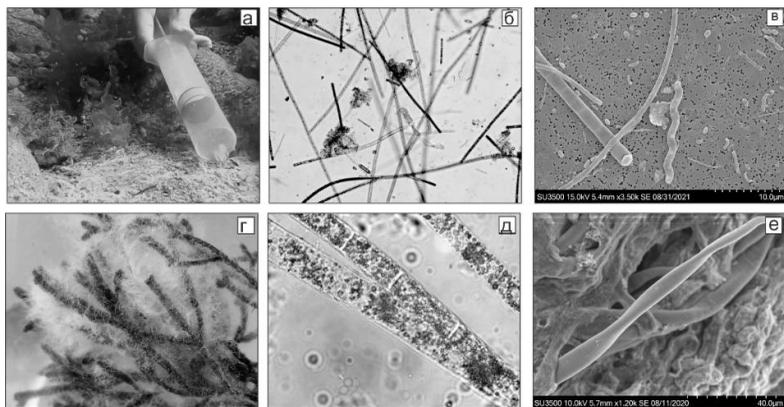


Рис. Подводные фотографии бактериальных пленок в районах прибрежных метановых газовыделений Крыма: на поверхности донных осадков (а) и прикрепленные формы серобактерий на талломах цистозир (г); световые микрофотографии микроорганизмов бактериального мата с поверхности осадка вблизи газовыделений, представленные различными морфологическими формами (б); световые микрофотографии нитчатых бактерий, заполненных серными гранулами (д); СЭМ микрофотографии образцов (в, е)

Отмечено, что в районах интенсивных пузырьковых газовыделений (б. Ласпи, мыс Фиолент), бактериальные сообщества на поверхности дна либо отсутствовали, либо обнаруживались лишь их следы в виде тончайших белесых пленок. Методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК в поверхностных горизонтах осадков б. Ласпи были выявлены сероокисляющие эpsilon-протеобактерии семейства *Thiovulaceae* (8,2 %), а глубже на горизонте 10–15 см самыми многочисленными оказались археи филогенетического кластера ANME-2a/b (19,2 %) и бактерии семейства *Desulfobacteraceae* (12,2 %), осуществляющие процесс анаэробного окисления метана.

Показано, что в местах газовыделений для формирования устойчивой бактериальной биопленки сульфид- и сероокисляющих бактерий, необходим стабильный флюидный поток восстановленных растворенных газов, тогда как точечная разгрузка пузырькового газа не обеспечивает достаточных градиентов концентрации и может механически разрушать структуру мата. Напротив, в местах непрерывного газовыделения (б. Ласпи) доля метанотрофов в составе бактериального сообщества донных осадков была значительно выше (до 2,1 % от общего количества прочтений), тогда как в районах сезонных газовыделений (мыс Феофан, б. Мраморная, б. Херсонесская), формирующихся в летне-осенний период, метанотрофы представляли минорный компонент сообщества [Тихонова, 2020].

Один из главных нерешенных вопросов в исследованиях прибрежных биогенных метановых сипов связан с природой их возникновения: формируют ли микробные сообщества подходящие условия для собственной жизнедеятельности, а газовыделения являются его следствием, или же их развитие связано с подтоком газа из более глубоких слоев? Изучения причин сезонных и межгодовых изменений активности газовыделений и структуры микробных сообществ поможет ответить на этот вопрос.

Работа выполнена по теме государственного задания ФИЦ Ин-БИОМ «Молисмологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем», регистрационный номер ААААА18-118020890090-2.

Литература

- Малахова Т. В., Иванова И. Н., Будников А. А., Мурашова А. И., Малахова Л. В. Распределение гидрологических параметров над площадкой метановых пузырьковых газовыделений в Голубой бухте (Черное море) – связь с субмаринной пресноводной разгрузкой // *Метеорология и гидрология*. 2021. № 11. С. 109–118.
- Малахова Т. В., Егоров В. Н., Малахова Л. В., Артемов Ю. Г., Пименов Н. В. Биогеохимические характеристики мелководных струйных метановых газовыделений в прибрежных районах Крыма в сравнении с глубоководными сипами Черного моря // *Морской биологический журнал*. 2020. Т. 5, № 4. С. 37–55.
- Тихонова Е. Н., Тарновецкий И. Ю., Малахова Т. В., Гулин М. Б., Меркель А. Ю., Пименов Н. В. Идентификация аэробных метаноокисляющих бактерий в прибрежных осадках Крымского полуострова // *Микробиология*. 2020. Т. 89, № 6. С. 737–747.
- Bryukhanov A. L., Vlasova M. A., Perevalova A. A., Pimenov N. V., Malakhova T. V. Phylogenetic diversity of the sulfur cycle bacteria in the bottom sediments of the Chersonesus Bay // *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2018. Vol. 87. V. P. 372–381.
- Pimenov N. V., Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Malakhova T. V., Samylyna O. S., Kaparatskii T. A., Tikhonova E. N., Vlasova M. A. Structure of Microbial Mats in the Mramornaya Bay (Crimea) Coastal Areas // *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2018. Vol. 87, № 5. P. 681–691.

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ РАСТЕНИЙ ГОРОХА С РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ В ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЕ

Л. Е. Макарова, Ю. А. Маркова, М. С. Карепова
А. С. Мориц, О. В. Захарова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

В научной литературе имеются доказательства сосуществования в клубеньках бобовых культур ризобий с эндофитными бактериями, неспособности последних самостоятельно вызывать образование клубеньков, их важной роли в питании, защите от патогенов и в регуляции роста растений [Гарипова, 2012]. Поселяющиеся в клубеньках неризобиальные эндофитные бактерии, видимо, способствуют функционированию азотфиксирующей системы, обеспечивают улучшение минерального питания и синтез биологически активных соединений [Benito et al., 2017]. В список таксонов эндофитных бактерий бобовых культур, входит более 25 неризобиальных и 10 ризобиальных родов [Dudeja et al., 2012; Martinez-Hidalgo, Hirsh, 2017]. Имеющиеся факты указывают на присутствие эндофитных бактерий у бобовых культур не только в клубеньках, но и в разных органах и сосудистых системах [Гарипова, 2012; Dudeja et al., 2012]. Эндофитные бактерии попадают в растения в основном через корневую систему из почвы и, отчасти, через устьица. Появления эндофитных бактерий в составе ризосферного микробиома возможно в результате миграции их из семени в корни. Вероятно, в прикорневой зоне происходит контролирование концентрации бактерий не только посредством биологически активных компонентов корневых экссудатов негативного действия, но и при участии выходящих из корней во внешнюю среду эндофитных бактерий.

Целью исследований стало выяснение роли в биоконтроле ризосферного микробиома эндофитных бактерий, появляющихся в прикорневой зоне корней проростков гороха в результате перемещения из корневых тканей во внешнюю среду. Выявляли изменения в микробиоме водной среды для роста корней проростков гороха (*Pisum sativum* L.) через 1 сут. после внесения в нее в качестве инокулятов бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* – эндосимбионт и патоген растений гороха, *Azotobacter chroococcum* и *Rhodococcus erythropolis* – свободно живущие бактерии. Оценивали взаимодействия растения с возникающими в водной среде ассоциациями бактерий по влиянию последних на рост корней.

Показано, что 6 из 11 бактериальных форм эндофитных бактерий, обнаруженных в семенах проростков гороха (*Pisum sativum* L.) оказывались во внешней среде в зоне роста корней. Показан различный характер взаимодействия в прикорневой зоне проростков гороха, росших в условиях гидрокультуры, эндофитных бактерий, появляющихся во внешней среде, с бактериями инокулятов. Благоприятным оказалось сосуществование в ризосфере ризобий, нодулирующих корни гороха, с эндофитными бактериями данного растения. *P. syringae* pv. *pisi*, патоген для растений гороха, поражающий органы надземной части данного растения, показал наименее интенсивный рост в среде роста корней, при сравнении с тремя видами бактерий-инокулятов, и обнаружил способность подавлять эндофитные бактерии растения-хозяина. Два свободноживущих вида бактерий, использованных в экспериментах, существенно отличались по активности роста в среде обитания корней и по характеру влияния на эндофиты гороха. Влияние корневых экссудатов гороха, очевидно, способствовало хорошей адаптации бактерии *Azotobacter*, которые при этом не вызвали значительных изменений в составе и концентрации эндофитных бактерий. Данный вид бактерий положительно влиял на рост корней проростков гороха. В противоположность азотобактерам, родококки показали в водной среде невысокий прирост, наибольшую для четырех обсуждаемых видов бактерий антибактериальную активность, а также ростиингибирующее влияние на корни гороха.

Важным в плане выяснения механизмов межмикробных взаимоотношений в эндо- и экторизосферах бобовых растений явилось обнаружение свойства у выделенных из прикорневой зоны проростков эндофитных бактерий – деградировать ПАУ до фталатов. Это было показано на примере негативного аллелопатического соединения N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА), представленного в тканях корней гороха и в корневых экссудатах этого растения. Основу предполагаемого механизма межмикробных взаимоотношений составляют различная чувствительность видов бактерий к фталатам, зависимость эффекта действия на бактерии фталатов от вида алкильных группировок в их молекулах и от типа существования бактерий (рост в планктоне или в биопленках). У культур эндофитных бактерий, оказывающихся в зоне роста корней, обнаружена различная по степени способность деградировать до образования фталатов (N-ФНА), негативное аллелопатическое соединение, выявленное ранее в корневых экссудатах бобовых культур. Высказано предположение, что данное свойство поз-

воляет эндофитным бактериям участвовать в контролировании растительно-микробных взаимодействий как в тканях растения-хозяина, так и в его ризосфере.

Были изучены морфологические показатели для клеток и колоний бактерий, реакция по Граму, биохимическая активность. Часть этих результатов приведены в таблице. Наличие активности ферментов, гидролизующих компоненты клеточных стенок – пектины и целлюлозу, объясняют способность выхода этих бактерий в ризосферу из тканей корня.

Таблица

Свойства эндофитных бактерий, выделенных из водной среды роста для корней проростков гороха

№ культуры	Амилазная активность (7 сут. экспозиции)	Протеолитическая активность (10 сут. экспозиции)	Целлюлазная активность за 3 сут., мг/мг белка	Пектиназная активность за 3 сут., мг/мг белка	Продуцирование ИУК, мг/мл среды за 3 сут.	Подвижность (10 сут. экспозиции)	Выделение газов (10 сут. экспозиции)
1	–	++ Разжижение среды	4,574	1,829	0,138±0,001	Хорошая	–
2	+	+	3,341	2,154	0,155±0,002	Слабая	–
3	–	+	3,941	1,462	0,864±0,009	–	+ (H ₂ O ₂)
4	–	++ Разжижение среды	2,818	1,931	0,146±0,005	–	–
5	+	+	1,267	1,990	0,579±0,018	–	–
6	–	+	4,433	1,576	0,167±0,0007	Хорошая	–

Обозначения в табл. 1: +, – – соответственно, наличие и отсутствие свойств.

Литература

Гарипова С. Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. С. 493–505.

Benito P., Alonso-Vega P., Aguado C., Luján R., Anzai Y., Hirsch A. M., Trujillo M. E. Monitoring the colonization and infection of legume nodules by *Micromonospora* in co-inoculation experiments with rhizobia // Scientific Reports. 2017. Vol. 7: 11051.

Dudeja S. S., Giri R., Saini R., Suneja-Madan P., Kothe E. Interaction of endophytic microbes with legumes // J. Basic Microbiol. 2012. Vol. 52. P. 248–260.

Martinez-Hidalgo P., Hirsh A. M. The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone // Phytobioms. 2017. Vol. 1. P. 70–82.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ДЕТЕРМИНАНТ ПАТОГЕННОСТИ СРЕДИ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЗДОРОВОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ХОЗЯЙСТВАХ ПЕРМСКОГО КРАЯ

В. С. Михайловская¹, О. А. Артамонова²
И. Н. Жданова³, М. В. Кузнецова³

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет
Пермь, e-mail: veranikamihailovskaja@yandex.ru

²Пермский государственный медицинский университет
имени академика Е. А. Вагнера, Пермь, e-mail: olga.artamonova.25@mail.ru

³Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
Пермь, e-mail: saratov_perm@mail.ru, mar19719@yandex.ru

Представители комменсальной *Escherichia coli* являются постоянными обитателями кишечного тракта крупного рогатого скота и поддерживают физиологический гомеостаз и колонизационную резистентность организма животного. Геном *E. coli* демонстрирует высокую степень гетерогенности, обусловленную горизонтальным переносом генов, ассоциированных с вирулентностью и антибиотикорезистентностью. В результате этого формируется патогенный потенциал симбиотических эшерихий, которые становятся источником детерминант патогенности для других микроорганизмов, либо, впоследствии, сами вызывают кишечные или внекишечные инфекции, клиническая симптоматика которых связана с наличием специфических факторов вирулентности и/или их комбинаций [Charman et al., 2006; Belanger et al., 2011]. Кроме того, известно, что внешне здоровый крупный рогатый скот является резервуаром шига-токсинов продуцирующих *E. coli* (STEC) и представителей других диареогенных *E. coli* (DEC), вызывающих вспышки заболеваний сельскохозяйственных животных и человека [Oporto et al., 2019]. В связи с этим, анализ генетических профилей штаммов *E. coli* – представителей кишечной микробиоты здорового крупного рогатого скота, имеет значение с точки зрения экологии, сельскохозяйственной и медицинской микробиологии, а также для совершенствования эпидемиологического контроля за данным возбудителем в животноводческих хозяйствах.

Цель исследования – оценить уровень распространения генов, кодирующих факторы вирулентности, среди штаммов *E. coli*, полученных от здорового крупного рогатого скота.

Методы и материалы. В работе были использованы штаммы *E. coli* (n = 49) с индивидуальным генетическим профилем, выделен-

ные в 2019–2021 гг. на предприятиях промышленного животноводства и частных фермерских хозяйствах Пермского края из фекалий здоровых коров (n = 22) и телят (n = 27). Методом ПЦР по конечной точке детектировали 18 генов, кодирующих токсины (*hlyA*, *hlyF*, *east1*, *ehxA*, *est1*, *eltA*, *stx1*, *stx2*, *cnf1*), адгезины (*fimH*, *papC*, *sfaDE*, *iha*, *usp*, *flu*), белок наружной мембраны (*ompT*), гены синтеза капсулы (*kpsMT*), системы захвата и транспорта железа (*iroN*).

Результаты. Все проанализированные штаммы содержали хотя бы один ген, ассоциированный с вирулентностью. Один ген был детектирован у шести (12,2 %) культур, два гена – у девяти (18,2 %), три гена – у пятнадцати (30,6 %), четыре и пять генов – у семи (14,3 %), шесть – у трех (6,1 %) штаммов. Обнаружены штаммы, содержащие сразу семь и восемь детерминант патогенности. Всего по сочетанию восемнадцати генов выявлен 41 индивидуальный генотип вирулентности.

Молекулярными методами у тридцати двух (65,3 %) исследуемых штаммов были обнаружены гены, кодирующие токсины. Выявлены ассоциированные с диареогенными патотипами гены: энтероагрегативного токсина *east1* (EAEC), энтерогемолизина *ehxA* (EPEC, EHEC), а также энтеротоксинов *est1* и *eltA* (ETEC). Следует отметить, что среди штаммов, полученных от здоровых животных, четыре культуры содержали гены шига-подобных токсинов *stx1* и *stx2*, что составило 8,2 % (табл.). Также выявили гены *hlyA* и *hlyF*, кодирующие человеческий и птичий гемолизины соответственно, связанные с внекишечными *E. coli* (ExPEC). Гены токсинов встречались как в моноварианте, так и в комбинациях: было обнаружено девять различных вариантов, из них наиболее распространенной оказалась комбинация *hlyF+east1*. Как и следовало ожидать, самым часто детектируемым геном адгезина был универсальный для *E. coli* *fimH*, вторым по распространенности оказался ген *flu*, связанный с уропатогенностью.

Таблица
Частоты встречаемости генов патогенности среди штаммов *E. coli*, выделенных от здорового крупного рогатого скота, N (%)

Гены токсинов	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>hlyA</i>	<i>hlyF</i>	<i>cnf1</i>	<i>east1</i>	<i>est1</i>	<i>ehxA</i>	<i>eltA</i>
		1 (2,1)	3 (6,1)	9 (18,4)	15 (30,6)	0	12 (24,5)	5 (10,2)	4 (8,2)
Прочие гены	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>sfaDE</i>	<i>usp</i>	<i>iha</i>	<i>flu</i>	<i>ompT</i>	<i>kpsMT</i>	<i>iroN</i>
	43 (87,8)	9 (18,4)	15 (30,6)	1 (2,0)	0	16 (32,7)	10 (20,4)	9 (18,4)	11 (22,4)

Различий в распространенности детерминант патогенности среди *E. coli*, циркулирующих на предприятиях и в частных хозяйствах, обнаружено не было. Статистический анализ показал незначительную разницу между группами штаммов, выделенных от животных разных возрастов – только гены *hlyF* и *ompT* были детектированы достоверно чаще в культурах, полученных от телят ($p < 0,05$).

Наличие потенциально патогенных и устойчивых к антимикробным препаратам штаммов *E. coli* может быть серьезной проблемой для здоровья животных. Выявлены штаммы, сочетающие в себе множественную лекарственную устойчивость (данные не приведены) и комбинации вирулентно-ассоциированных генов. Так, например, встречались штаммы, которые содержали более пяти генов патогенности и были нечувствительны к четырем антибиотикам.

Данные исследования показали, что штаммы *E. coli*, циркулирующие среди здоровых животных на фермах и предприятиях животноводства, характеризуются высоким гетеропатогенным потенциалом. Крупный рогатый скот является резервуаром патогенных *E. coli*, которые могут стать причиной острых кишечных инфекций, так как содержат гены, специфичные для патотипов DEC, в том числе, STEC и EAEC. В рассматриваемой популяции эшерихий были распространены и представители ExPEC, которые могут стать причиной внекишечных инфекций, а также «гибридные» штаммы, сочетающие гены, ассоциированные с разными патотипами *E. coli*. Бактерии сохраняются в стаде длительное время, перемещаясь среди животных всех возрастов, что представляет риск как для самих животных, так и для общественного здравоохранения. Таким образом, данные о молекулярных свойствах представителей кишечной микробиоты здорового крупного рогатого скота позволяют оценить их эпизоотическую значимость и являются основой системы мониторинга колибактериоза на сельскохозяйственных предприятиях.

Работа выполнена при поддержке правительства Пермского края по гранту № С-26/541.

Литература

- Bélangier L., Garenaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., Dozois C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2011. Vol. 62. P. 1–10.
- Chapman T. A., Wu X.-Y., Barchia I., Bettelheim K. A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J. J.-C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, N 7. P. 4782–95.
- Oporto B., Ocejo M., Alkorta M., Marimón J. M., Montes M., Hurtado A. Zoonotic approach to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: integrated analysis of virulence and antimicrobial resistance in ruminants and humans // Epidemiol. Infect. 2019. Vol. 147. P. 1–9.

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *PECTOBACTERIUM* SPP. С РАСТЕНИЯМИ-ХОЗЯЕВАМИ

Е. А. Николайчик, П. В. Вычик, А. Н. Крук
Ю. В. Дюбо, А. В. Колубако

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: nikolaichik@bio.bsu.by

Представления о растительно-микробных взаимодействиях в значительной степени базируются на исследованиях небольшой группы модельных растений и микроорганизмов, а также их комбинаций – модельных патосистем. В качестве примера последних можно привести патосистему *Pseudomonas syringae* – *Arabidopsis thaliana*. Но даже для этой патосистемы исход взаимодействия, помимо очевидного влияния условий культивирования, очень сильно зависит от используемых штамма патогена и линии хозяина: минимальные отличия генотипов могут приводить к принципиально разному исходу. Однако при анализе генотипов членов патосистемы гораздо больше внимания уделяется отличиям наборов генов или их кодирующих последовательностей, чем регуляции близких или идентичных генов.

Пектобактерии традиционно считались неспециализированными патогенами, опирающимися в основном на массивную продукцию гидролитических экзоферментов и поэтому не требующих сложных коммуникаций с растением, однако становится все более очевидным, что *Pectobacterium* spp. – достаточно специализированные патогены с тонкой адаптацией к узкому спектру растений-хозяев, а тезис о широкой хозяйской специфичности пектобактерий во многом обусловлен несовершенством их классификации.

В настоящей работе обсуждаются результаты анализа транскрипционной регуляции формирования патосистем с участием *Pectobacterium* spp. (в основном с бактериальной стороны). Большое количество геномных данных и первые массивы транскриптомных данных, доступные для пектобактерий, а также разработанное нами ранее специализированное программное обеспечение для анализа транскрипционной регуляции [Nikolaichik 2016, 2020] позволили выполнить полногеномный анализ транскрипционной регуляции для двух видов пектобактерий. Часть выявленных тенденций была верифицирована экспериментально [Kravchenko 2021].

Ключевые выводы этого анализа будут справедливы для большинства таксономических групп фитопатогенов:

- Набор генов основных факторов вирулентности, в том числе гидролитических ферментов, очень близок у разных видов и штаммов, но регуляторные области и экспрессия многих генов различаются радикально

- До половины всех генов пектобактерий в конкретных условиях могут не экспрессироваться или иметь очень низкий уровень экспрессии, при этом часть «не экспрессирующихся» генов являются ключевыми факторами вирулентности

- Миниатюрные мобильные элементы (MITE) расположены преимущественно в межгенных регуляторных областях, очевидно влияют на регуляцию, но практически никогда не аннотированы и поэтому не учитываются

- Пектобактерии имеют около 350 транскрипционных факторов, примерно четверть из них могут быть не аннотированы как таковые

- Гены транскрипционных факторов и распознаваемые их продуктами операторы более вариабельны, чем большинство прочих компонентов генома

- Глобальные транскрипционные регуляторы более консервативны, но их регулоны более вариабельны. Для локальных регуляторов справедливо обратное

- Процент дифференциально экспрессируемых в растении генов выше среди транскрипционных факторов, чем в прочих функциональных категориях (более половины ТФ могут менять уровень экспрессии в растении).

- Наборы дифференциально экспрессируемых генов мало совпадают для родственных патосистем, а для транскрипционных регуляторов совпадений еще меньше.

- Многие транскрипционные факторы (и соответственно их регулоны) радикально меняют уровень экспрессии по мере развития заболевания.

- Полногеномный анализ транскрипционной регуляции *in silico* существенно облегчает понимание происходящих при формировании патосистем процессов и упрощает их экспериментальное исследование.

Перечисленные выше факторы определяют принципиально разный характер экспрессии генов близкородственных штаммов при заражении родственных растений, из-за чего перенос выводов, сделанных для одной патосистемы на другую с родственными патогеном и хозяином часто будет некорректен.

В качестве примеров возможностей, которые предоставляет для понимания комбинация *in silico* и экспериментальных подходов к исследованию транскрипционной регуляции, в докладе будут приведены наши данные по роли глобальных регуляторов семейств OmpR и LuxR в динамике формирования патосистем с участием *Pectobacterium* spp.

Литература

Kravchenko U., Gogoleva N., Kalubaka N., Kruk A., Diubo Y., Gogolev Y., Nikolaichik Y. The PhoPQ two-component system is the major regulator of cell surface properties, stress responses and plant-derived substrate utilisation during development of *Pectobacterium* versatile-host plant pathosystems // *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 11: 621391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621391>

Nikolaichik Y., Vychik P. New approach to genome-wide automated inference of bacterial transcription factor binding sites // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/ Systems Biology*. Novosibirsk: Institute of cytology and genetics. 2020. P. 75–76. <https://doi.org/10.18699/BGRS/SB-2020-046>

Nikolaichik Y., Damienikan A. U. SigmaID: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals // *PeerJ*. 2016. Vol. 4: e2056. <https://doi.org/10.7717/peerj.2056>

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ МЕТОДОМ ДРИМ *ESCHERICHIA COLI* С ЦЕЛЬЮ КОНТРОЛЯ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В ОТНОШЕНИИ КОЛИБАКТЕРИОЗА В ПТИЦЕВОДСТВЕ

О. Б. Новикова¹, В. П. Терлецкий¹, М. А. Ладанова²

¹Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Санкт-Петербург, Ломоносов, e-mail: ksuvet@mail.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины Санкт-Петербург, e-mail: ldnvmr@gmail.com

Болезни бактериальной этиологии занимают существенное место в патологии птиц. Наличие их в хозяйстве негативно сказывается как на эпизоотической ситуации, так и на экономике предприятия. Ведущее место среди них занимает колибактериоз, вызываемый вирулентными штаммами кишечной палочки *Escherichia coli* (*E. coli*). Нередко кишечная палочка является фундаментом для развития смешанных инфекций, что значительно затрудняет диагностику. Во многих случаях колибактериоз является вторичным, развивается на фоне какой-либо вирусной инфекции. Использование современных методов генотипирования позволяет ответить на вопросы эпизоотологического плана, в частности, каким путем происходит передача возбудителя и где находится источник инфекции. Помимо этого определенный

фрагмент ДНК может быть сцеплен с важной биологической особенностью штамма, что позволит использовать его в качестве маркера данного свойства. На сегодня самым точным методом генотипирования является метод ДРИМ (двойное расщепление и избирательное мечение), впервые разработанный для клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella* spp. [Terletskiy et al., 2008; Terletskiy et al., 2010]. Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами, избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК с последующей их визуализацией. Для каждого вида микроорганизма подбирается пара эндонуклеаз, дающих оптимальное число и распределение фрагментов ДНК. Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма.

Цель нашей работы – использовать идею ДРИМ для разработки метода генотипирования *E. coli*, вызывающей патологию у сельскохозяйственной птицы. В результате в отношении *E. coli* предложены два фермента рестрикции: крупнощепляющая рестриктаза *XbaI* и мелкощепляющая рестриктаза *PstI*. Методом ДРИМ проведено генотипирование 29 изолятов *E. coli*, выделенных из разных органов трупов кур двух птицефабрик по производству яйца одного региона Центрального федерального округа России. Возраст птицы – 300 дней, кросс – Хайсекс коричневый. По результатам генотипирования было выявлено 14 различных генотипов (табл.).

Таблица

Генотипы культур *E. coli*, выделенных от кур птицефабрик по производству яйца (с 1 по 18 – птицефабрика № 1, 19–29 – птицефабрика № 2), выявленные методом ДРИМ

Номера генотипов	Номера идентичных изолятов	Номера генетически близких изолятов	Номера генетически удаленных изолятов
1	1; 2; 3; 4; 6; 7; 8; 10; 11; 12; 13; 14		
2		5 – отличие на 3 фрагмента от генотипа 1	
3		15 – отличие на 2 фрагмента от генотипа 1	
4		16 – отличие на 3 фрагмента от генотипа 1	
5	21; 22		
6	23; 25; 26		

Номера генотипов	Номера идентичных изолятов	Номера генетически близких изолятов	Номера генетически удаленных изолятов
7		24 – отличие на 2 фрагмента от генотипа 6	
8	28; 29		
9		27 – отличие на 2 фрагмента от генотипа 8	
10			9
11			17
12			18
13			19
14			20

Были выявлены группы идентичных штаммов, которые имели одинаковый профиль всех фрагментов ДНК. Самой большой группой идентичных штаммов оказались изоляты 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 и 14, обозначенные как генотип 1. Другие генотипы включали 2–3 изолята, либо были уникальными (1 изолят). Во многих случаях идентичные штаммы выделяли из органов одной и той же особи (изоляты 1, 2, 3 и 4). В отдельных случаях были выявлены близкородственные штаммы бактерий, отличающиеся друг от друга на 1–3 фрагмента ДНК. Эти штаммы бактерий были выделены из различных органов одной и той же особи. В данном случае можно говорить об инфицировании одновременно двумя штаммами, либо, что более вероятно, о возникновении мутации у бактерий, размножающихся в отдельных органах курицы. Данные мутации могут быть индуцированными (вызванными внешними воздействиями) вследствие широкого и зачастую бесконтрольного применения в птицеводстве антибактериальных препаратов. С целью выживаемости в организме-хозяине микроорганизмы постепенно адаптируются и повышают свою резистентность к антибиотикам. Также в процессе мутаций может повышаться или снижаться вирулентность микроба. Данные мутации передаются по наследству и сохраняются, даже когда вызывавший их фактор (применение антибиотика) перестает действовать.

Примером близкородственных штаммов, выделенных из одной особи № 1 птичника 1, являются изоляты 15 и 16, которые незначительно отличаются от большой группы идентичных изолятов. В то же время можно говорить о независимом инфицировании особи двумя совершенно разными штаммами в случае особи № 3. Бактерии, выделенные из печени особи № 3 птичника 1 (изолят 9, генотип 10), сильно

отличались от бактерий, выделенных из сердца (изолят 8, генотип 1), яичного фолликула (изолят 10, генотип 1) и костного мозга (изолят 11, генотип 1). В ряде случаев были выявлены генотипы бактерий, значительно отличающиеся друг от друга и от кластеров идентичных изолятов. В частности, изоляты под номерами 9, 17, 18, 19, и 20 встречались только один раз. Результаты свидетельствуют о возможном перезаражении кур друг от друга. Особенно это проявляется у кур из одного птичника. В частности, один и тот же штамм циркулировал у особей № 1 (изоляты 1, 2, 3 и 4), № 2 (изоляты 6, 7), №3 (изоляты 8, 10 и 11) и № 4 (изоляты 12, 13 и 14). Все особи содержались в птичнике 1. Полученные данные генотипирования изолятов *E.coli* на примере птицефабрики указывают на отсутствие перезаражения кур, содержащихся в разных птичниках. Все штаммы от кур из разных птичников имели отличающиеся бактериальные генотипы. Данный факт свидетельствует об адекватности санитарных преград между птичниками.

Перспективно внедрение и использование в практике нового метода генотипирования бактериальных изолятов ДРИМ для идентификации микроорганизмов с целью поиска путей передачи инфекции и выявления источника патогена, а также для решения других вопросов эпидемиологии и эпизоотологии, генетической паспортизации штаммов.

Литература

Terletskiy V., Kuhn G., Francioli P., Blanc D. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates // *Journal of Microbiological Methods*. 2008. Vol. 72, № 3. P. 283–287.

Terletskiy V. P., Tyshchenko V. I., Martinez-Ballesteros I., Garaizar J., Bikandi J. Validation of Double Digest Selective Label database for sequenced prokaryotic genomes // *Bioinformatics*. 2010. Vol. 26, № 3. P. 417–418.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЛЕЦИОННОГО МУТАНТА *ERWINIA AMYLOVORA* ПО ГЕНУ ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА *SLYA*

К. Ю. Песоцкая, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: lagonenkoal@mail.ru

Фитопатогенные бактерии встречаются среди представителей родов *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Ralstonia* и др. Эти бактерии являются возбудителями большого количества бактериозов растений, таких как вилты (увядания), бактериальный рак растений, мягкие гнили, некрозы и др. [Горшков, 2017].

Одним из наиболее вредоносных заболеваний растений является бактериальный ожог плодовых, вызываемый грамотрицательной бактерией *Erwinia amylovora*. На сегодняшний день вспышки заболевания зарегистрированы в более чем 50 странах мира, включая страны Северной Америки, Европы, а также страны Среднего Востока, Океании и Азии. В настоящее время известно, что *E. amylovora* продуцирует большое количество факторов вирулентности: систему секреции III типа, экзополисахариды амиловоран и леван, а также подвижность клеток *E. amylovora* и их способность образовывать биопленки [Zhao et al., 2019].

Транскрипционный фактор SlyA принадлежит к семейству транскрипционных регуляторов MarR (*Multiple Antibiotic Resistance*), изменяющих экспрессию генов, вовлеченных в различные клеточные процессы, например, вирулентность (SlyA у *Salmonella typhimurium*, PecS у *Dickeya dadantii*, Ног у *Pectobacterium carotovorum*), стрессовые реакции, формирование биопленок и выведение широкого спектра соединений, токсичных для бактериальных клеток: антибиотиков (MarR у *Escherichia coli* и MexR у *Pseudomonas aeruginosa*), фенольных соединений (HpaR и HpcR у *E. coli*), активных форм кислорода, а также бытовых моющих и дезинфицирующих средств [Ellison, 2006].

Анализ генома *Erwinia amylovora* E2 позволил найти четыре гена, кодирующие регуляторы MarR-семейства: *mprA* (координаты в геноме 2834616..2835146 п.н.), *marR* (1533551..1533982 п.н.), *ohrR* (3717873..3718340 п.н.) и *slyA* (1802653..1803090 п.н.).

В ходе данной работы для изучения роли SlyA в регуляции необходимых для патогенности клеточных процессов был сконструирован делеционный мутант *E. amylovora* по соответствующему гену. Для инактивации гена *slyA* были сконструированы праймеры для амплификации гена устойчивости к канамицину в составе плазмиды pKD13, несущие на 5'-конце последовательности (50 н.) соответствующие началу или концу делетируемой области генома *Erwinia amylovora*. Полученные с помощью таких праймеров ПЦР-продукты были трансформированы в клетки *Erwinia amylovora* E2, несущие хелперную плазмиду pKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы. В результате проделанной работы был отобран штамм устойчивый к канамицину. Наличие мутации было подтверждено ПЦР с праймерами к областям, фланкирующим делецию, а также с внутренними праймерами к гену устойчивости к канамицину. В результате ПЦР были получены фрагменты ДНК ожидаемых размеров.

На следующем этапе исследований было изучено фенотипическое проявление полученной мутации. Было показано, что клетки делеционного мутанта *E. amylovora* обладали сниженной вирулентностью при искусственном заражении растений груши. Мутантный штамм продуцировал сниженное количество амиловорана и левана – важных факторов вирулентности.

Проведенные нами эксперименты по определению подвижности клеток в полноценной и минимальной средах культивирования выявили достоверные отличия между значениями, полученными для клеток штамма дикого типа и делеционного мутанта: делеция гена *slyA* у *E. amylovora* E2 привела к снижению подвижности клеток. Присутствие в клетках белка SlyA в количествах, значительно превышающих физиологические, приводило к восстановлению исходного фенотипа.

Развитие многих бактериальных инфекций, в том числе бактериозов растений, связано с формированием биопленок – сообществ микроорганизмов, клетки которых прикреплены к различной биотической и абиотической поверхности и погружены в биополимерный матрикс [Castiblanco, 2016]. Для изучения способности клеток $\Delta slyA$ образовывать биопленки были использованы полноценная (LB) и минимальная (M9) питательные среды. В результате работы было установлено, что при культивировании мутантного штамма и штамма дикого типа в минимальной среде в течение 72 ч способность формировать биопленки у клеток *E. amylovora* $\Delta slyA$ была достоверно увеличена в сравнении с диким типом.

Влияние перекиси водорода, полимиксина В и гипохлорита натрия на выживаемость клеток *E. amylovora* оценивалась по количеству колоний микроорганизмов, выросших на агаризованной среде после обработки клеток вышеперечисленными токсичными веществами. Согласно полученным данным, при инкубации бактерий в присутствии 25 мМ H_2O_2 выживаемость клеток *E. amylovora* $\Delta slyA$ была снижена в два раза по сравнению с контролем. При обработке $\Delta slyA$ 50 мМ и 100 мМ перекиси все клетки погибали. Выживаемость *E. amylovora* $\Delta slyA$ в присутствии 5 мМ раствора гипохлорита натрия составила 0 %. Выживаемость клеток делеционного мутанта после обработки полимиксином В в концентрации 5 мкг/мл была снижена в три раза по сравнению с клетками штамма дикого типа.

Таким образом, в ходе исследования нами были получены данные, указывающие на то, что транскрипционный регулятор SlyA вовлечен в регуляцию вирулентности, подвижности клеток *E. amylovora*, продукции экзополисахаридов (амиловорана, левана и целлюлозы), процесса формирования биопленок и устойчивости к воздействию различных токсичных соединений.

Литература

- Горшков В. Ю. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем. Казань : Изд-во Сергея Бузукина, 2017. 304 с.
- Castiblanco L. F., Sundin G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria // Journal of Integrative Plant Biology. 2016. Vol. 58, N 4. P. 362–372.
- Ellison D. W., Miller V. L. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family // Current Opinion in Microbiology. 2006. Vol. 9, N 2. P. 153–159.
- Zhao Y., Tian Y., Wang L., Geng G., Zhao W., Hu B., Zhao Y. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China // Journal of Integrative Agriculture. 2019. Vol. 18, N 4. P. 815–820.

АНАЛИЗ ПРИЗНАКОВ АДАПТАЦИИ К СРЕДЕ ОБИТАНИЯ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *FLAVOBACTERIUM* МЕТОДАМИ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

И. С. Петрушин^{1,2}, Д. И. Гутник², Е. О. Пушмина²

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

e-mail: ivan.kiel@gmail.com

Бактерии в природных экологических нишах эволюционируют в высококонкурентной среде, и невостребованные гены испытывают давление отбора. Вместе с тем для адаптации к среде или хозяину в геноме должны содержаться гены метаболизма высокомолекулярных соединений (источников питания), защиты от патогенов и возможного ответа на стрессовые воздействия. Как правило, чем стабильнее условия обитания, тем меньшим набором генов может обойтись бактерия. Представители семейства *Flavobacterium* встречаются в водных и наземных нишах, некоторые из них известны как патогены животных и эндофиты растений. Как многие из рода *Bacteroidetes*, они способны разлагать широкий спектр полисахаридов. Для этого в их геноме содержатся локусы утилизации полисахаридов (polysaccharide utilization loci, PULs). Ряд исследователей указывают на то, что геномная организация и размер самого генома зависят от ниши (водной или наземной) [Kolton et al., 2013; Wan, 2019]. Кроме того, состав PULов отличается для «водных» и «наземных» штаммов.

В предыдущей работе был выделен штамм *Flavobacterium* sp. SLB02 из больных пресноводных губок вида *Lubomirskia baicalensis* [Petrushin et al., 2020]. Геном этой бактерии, имеющий размер характерный для «наземных» штаммов, выделен из организма, живущего в пресной воде.

Целью данной работы является анализ признаков адаптации к среде представителей семейства *Flavobacterium* и, в частности, штамма *Flavobacterium* sp. SLB02 методами сравнительной геномики.

Объекты и методы исследования. В базе NCBI GenBank доступно более 600 опубликованных геномов бактерий семейства *Flavobacterium*. Для анализа за основу нами взят перечень штаммов из работ [Kolton et al., 2013; Wan, 2019], Структура локусов определялась программой PULpy [Stewart et al., 2018]. Кластеризация штаммов по набору признаков в многомерном пространстве выполнена методом главных компонент.

Результаты и обсуждения. Проведен анализ нескольких групп генов, связанных с адаптацией к среде представителей семейства *Flavobacterium*. С помощью многомерного анализа построена диаграмма, позволяющая оценить сходство штаммов по набору признаков. Большая часть штаммов, выбранных для анализа, принадлежит к одному из двух кластеров, которые мы обозначили как «водные» и «наземные». Используемая методика может быть использована для подбора штаммов, близких по условиям обитания. Целью дальнейшей работы является детальный анализ признаков адаптации к хозяину хост-ассоциированных штаммов.

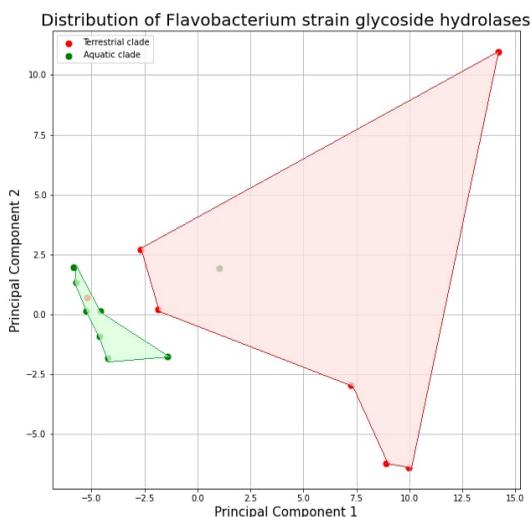


Рис. Кластеризация штаммов на основе состава генов кодирующих гидролазы

Литература

- Kolton M., Sela N., Elad Y., Cytryn E. Comparative genomic analysis indicates that niche adaptation of terrestrial flavobacteria is strongly linked to plant glycan metabolism // PLoS ONE. 2013. Vol. 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076704>
- Petrushin I. S., Belikov S. I., Chernogor L. I. Draft genome sequence of *Flavobacterium* sp. Strain slb02 isolated from the diseased sponge *Lubomirskia baicalensis* // Microbiology Resource Announcements. 2020. Vol. 9(26). <https://doi.org/10.1128/mra.00530-20>
- Stewart R., Auffret M., Roehe R., Watson M. Open prediction of polysaccharide utilisation loci (PUL) in 5414 public Bacteroidetes genomes using PULpy // BioRxiv. 2018. <https://doi.org/10.1101/421024>
- Wan, X. Comparative genome analyses reveal the genomic traits and host plant adaptations of *Flavobacterium akiainvivens* IK-1t // International Journal of Molecular Sciences. 2019, Vol. 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194910>

АДАПТАЦИИ И КОЭВОЛЮЦИЯ ПАРТНЕРОВ В СИСТЕМАХ ВНУТРИЯДЕРНЫХ СИМБИОЗОВ МЕЖДУ ИНFUЗОРИЯМИ И БАКТЕРИЯМИ

А. А. Потехин¹, Ю. А. Яковлева¹, А. С. Балкин², Е. В. Пенькова¹,
С. А. Чекрыгин¹, М. С. Мелехин¹, Д. А. Корсун¹, Н. А. Лебедева³

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
e-mail: alexey.potekhin@spbu.ru

²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

³Ресурсный центр «Культивирование микроорганизмов», Санкт-Петербургский
государственный университет, Санкт-Петербург

Некоторые представители семейств *Holosporaceae* и *Rickettsiaceae* (*Alphaproteobacteria*) образуют устойчивые симбиотические системы с инфузориями *Paramecium*, поселяясь у них в ядрах. Бактерии родов *Trichorickettsia* и *Megaira* (*Rickettsiaceae*) не обладают способностью к инфекции и сложным жизненным циклом, хотя характеризуются высокой морфологической пластичностью, способностью населять макронуклеус или цитоплазму разных видов парамеций-хозяев, а некоторые изоляты обладают подвижностью [Sabanejeva et al., 2018; Lanzoni et al., 2019]. Эти симбионты передаются строго по вертикали, при делении инфузории-хозяина.

Представители родов *Holospora* и *Preeria* (*Holosporaceae*) являются облигатными внутриядерными симбионтами, их яркими особенностями являются высокая инфекционность, сложный жизненный цикл, выраженная селективность к типу ядра (макронуклеус или микронуклеус) и, для *Holospora*, строгая специфичность к виду хозяина [Potekhin et al., 2018; Schrallhammer and Potekhin, 2020]. Проникновение этих бактерий в клетку инфузории проходит в несколько стадий. Инфузория фагоцитирует инфекционные формы бактерий, которые

затем выходят из пищеварительной вакуоли, по цитоплазме добираются до ядра и проникают внутрь него, а затем дифференцируются в репродуктивные формы и приступают к делениям. Через некоторое время происходит обратная дифференцировка репродуктивных форм в споры, которые выводятся в окружающую среду. Каждый из этих этапов регулируется генетически как со стороны симбионта, так и со стороны хозяина, и существует генотипическая совместимость партнеров. Система *Paramecium aurelia* – *Preeria caryophila* разрабатывается нами как модель для анализа генетических механизмов формирования симбиозов между протистами и бактериями.

Внутриядерные симбионты вынуждены адаптироваться к особенностям биологии своего хозяина. Так, *Holospora* и *Preeria* по-разному осуществляют выход из пищеварительной вакуоли и колонизацию ядра хозяина. В каждом жизненном цикле в ходе половой реорганизации ядер инфузории разбирают старое соматическое ядро и формируют новое, что заставляет симбионтов макронуклеуса искать способы сохранения в хозяине. Выживание в ядре требует от бактерий метаболической приспособленности. Однако и инфузории вынуждены адаптироваться к бактериям, паразитирующим в их ядерном аппарате. Молекулярные и генетические особенности взаимодействий партнеров по внутриядерным симбиозам пока изучены далеко не полностью. Проводимые нами сравнительные исследования геномов нескольких видов бактерий, населяющих ядра инфузорий *Paramecium*, должны пролить свет на регуляцию и эволюцию этих необычных симбиотических систем.

Исследования проводятся при поддержке гранта РФФ 20-14-00220.

Литература.

Lanzoni O., Sabaneyeva E., Modeo L., Castelli M., Lebedeva N., Verni F., Schrallhammer M., Potekhin A., Petroni G. Diversity and environmental distribution of the cosmopolitan endosymbiont “*Candidatus Megaira*”. Scientific Reports. 2019. Vol. 9. 1179.

Potekhin A., Schweikert M., Nekrasova I., Anikina A., Vitali V., Schwartz S., Kaltz O., Petroni G., Schrallhammer M. Complex life cycle, broad host range and adaptation strategy of the intranuclear *Paramecium* symbiont *Preeria caryophila* comb. nov. FEMS Microbiology Ecology. 2018. Vol. 94. fyy076.

Sabayeva E., Castelli M., Szokoli F., Benken K., Lebedeva N., Salvetti A., Schweikert M., Fokin S., Petroni G. Host and symbiont intraspecific variability: The case of *Paramecium calkinsi* and «*Candidatus Trichorickettsia mobilis*». European Journal of Protistology. 2018. Vol. 62. P. 79–94.

Schrallhammer M., Potekhin A. Epidemiology of nucleus-dwelling *Holospora*: infection, transmission, adaptation, and interaction with *Paramecium*. Results and Problems in Cell Differentiation. Vol. 69. P. 105–135.

ПОИСК И АНАЛИЗ СТРУКТУР CRISPR/CAS СИСТЕМ В ГЕНОМАХ *LIMOSILACTOBACILLUS FERMENTUM* И ИХ ФАГОВЫХ АНТАГОНИСТОВ МЕТОДАМИ БИОИНФОРМАТИКИ

Г. А. Тетерина¹, Н. А. Арефьева¹, А. И. Носова¹
Ю. П. Джюев², Г. В. Юринова¹, А. А. Приставка¹
А. Ю. Борисенко², Л. А. Степаненко², Я. А. Портная³
В. П. Саловарова¹, В. И. Злобин²

¹Иркутский государственный университет, Иркутск

²Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

Введение. Бактерия *Limosilactobacillus fermentum* (ранее *Lactobacillus fermentum*) является грамположительным видом гетероферментативного рода *Limosilactobacillus* и часто встречается при ферментации животных и растений [Zheng et al., 2020]. *L. fermentum* отличается от большинства других видов этого рода, поскольку не является стабильным членом кишечной микробиоты человека или животных. [Duar et al., 2017] Было обнаружено, что некоторые штаммы *L. fermentum* обладают естественной устойчивостью к определенным антибиотикам и химиотерапевтическим средствам. *L. fermentum* обладает толерантностью к желудочному соку и солям желчи, а также проявляет антагонистическое действие в отношении индикаторных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* и *Staphylococcus aureus* [Lin et al., 2007]. Постоянное антагонистическое воздействие экзогенной ДНК фагов и плазмид вынудило бактерий создать свою систему «адаптивного иммунитета», названная CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins [Horvath et al., 2010]. CRISPR-Cas системы у представителей рода *Lactobacillus* были в 63 % проанализированных геномов посредством методов биоинформатики [Biswas et al., 2016]. Характеристика системы CRISPR-Cas у лактобактерий имеет большое значение для понимания генетической основы ее пробиотических свойств и разработки пробиотической терапии.

Цель. Поиск и анализ структур CRISPR-Cas в геномах пробиотической бактерий *Limosilactobacillus fermentum* и оценка разнообразия их фаговых антагонистов.

Материалы и методы. Объектом исследования были 10 геномов *L. fermentum* из базы данных NCBI NT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Поиск CRISPR-Cas систем осуществлялся с помощью программ:

CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>), CRISPRminer (<http://www.microbiome-bigdata.com/CRISPRminer/>) и PILER-CR. После подтверждения наличия CRISPR данные спейсеров были получены с упомянутых серверов. Предполагаемые совпадения спейсеров были исследованы с использованием инструмента CRISPRTarget (http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html). С помощью инструмента BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD>) были выявлены области локального сходства между последовательностями спейсеров и протоспейсеров. Для поиска протоспейсеров использовались следующие базы данных: а) PhagesDB; б) GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); с) ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>).

Результаты. При исследовании в геномах штаммов *L. fermentum* было выявлено три типа CRISPR-Cas систем, которые принадлежат к разным классам (рис. 1). Преимущественно были выражены системы 1 класса, которые принадлежат к подтипу I-E, встречающемуся с частотой 43,8 %, и подтипу I-C, который наблюдался в 6,3 % исследуемых геномах. Подтип II-A, принадлежащий ко 2 классу, встречался в 43,8 % штаммах. Геномы, не содержащие CRISPR-Cas системы, встречались с частотой 6,3 %. Кластеры генов *cas* везде были представлены в полном составе.

Интересная особенность одного из штаммов *L. fermentum* заключалась в том, что в его геноме было обнаружено два типа CRISPR-Cas системы (подтип II-A и подтип I-C), а в других 5 штаммах наблюдался симбиоз из подтипа II-A и I-E. Таким образом, в 66,7 % исследуемых геномах штаммов *L. fermentum* использовалось одновременно два типа CRISPR-Cas систем и только в 33,3 % CRISPR-Cas система была представлена одним типом. В ходе исследования в геномах штаммов *L. fermentum* было установлено 56 соответствий геномам фагов, которые разделились на три группы. Самая многочисленная группа представлена видами фагов *Lactobacillus*, выявленных в 92,86 % штаммов (рис. 2). Далее в 5,36 % были зафиксированы фаги рода *Enterococcus* и меньше всего были представлены фаги рода *Bacillus*, на который приходится 1,79 %.

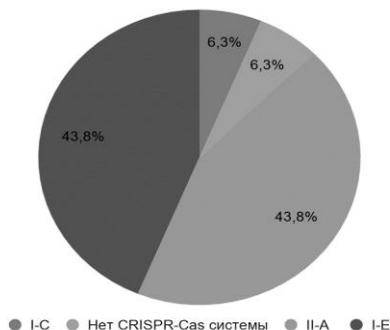


Рис. 1. Распределение CRISPR-Cas систем в исследуемых штаммах *L. fermentum*

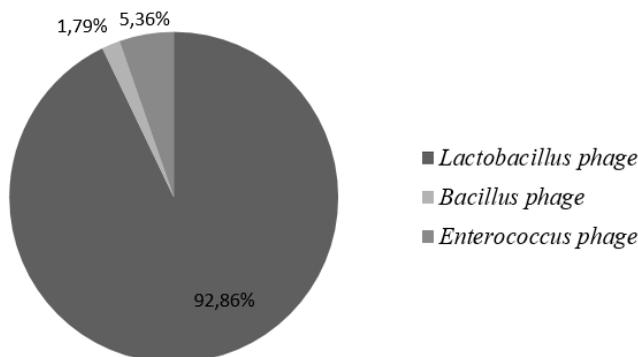


Рис. 2. Идентифицированные фаги, комплементарные спейсерам CRISPR-Cas систем в исследуемых геномах штаммов *L. fermentum*

Литература

Duar R. M., Lin X. B., Zheng J. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus* // FEMS Microbiology Reviews, 2017. Vol. 41(1). P. S27–S48.

Zheng J., Wittouck S., Salvetti E. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2020. Vol. 70(4), P. 2782–2858.

Lin W.-H., Yu B., Jang S.-H., Tsen H.-Y. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry // Anaerobe. 2007. Vol. 13(3-4). P. 107–13.

Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea // Science. 2010. Vol. 327, № 5962. P. 167–170.

Biswas A., Staals R. H., Morales S. E., Fineran P. C., Brown C. M. CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays // BMC genomics. 2016. Vol. 17(1).

ПРИРОДНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ДНК ДЛЯ УХОДА ОТ ИММУННОГО ОТВЕТА У *MYCOPLASMA* *GALLISEPTICUM*

Г. Ю. Фисунов, Д. В. Евсютина, Т. А. Семашко
Е. А. Цой, В. М. Говорун

ФБУН НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора, Москва
e-mail: herr.romanoff@gmail.com

Одним из распространенных механизмов ухода патогенных микроорганизмов от иммунного надзора является вариабельность антигенных структур, в частности поверхностных белков адгезии. Представители класса Молликут демонстрируют несколько вариантов механизмов вариабельности поверхностных адгезинов. Механизм рекомбинационной вариабельности основан на гомологичной рекомбинации между кодирующей частью адгезина и случайным гомологичным фрагментом кодирующей части из специальной кассеты с набором таких фрагментов. Механизм вариабельности с помощью генетических перестроек основан на случайной рекомбинации между единственным активным промотором и набором кодирующих последовательностей адгезинов. Также известен механизм вариабельности на основе случайной гомологичной рекомбинации между гомологичными фрагментами внутри одной кодирующей последовательности.

Узкая филогенетическая группа микоплазм в составе *M. gallisepticum*, *M. imitans* и *M. tullyi* имеет уникальный механизм вариабельности адгезинов. Эти бактерии имеют кассеты генов адгезинов-гемагглютининов VlhA в количестве нескольких десятков генов на геном. Согласно литературным данным активность промоторов генов vlhA определяется числом повторов GAA в составе промотора. Активный вариант промотора возникает, если число повторов равно 12. Также согласно литературным данным число повторов случайно и самопроизвольно варьирует [Liu et al., 2000]. При этом наличие антител против мажорного (экспрессируемого в текущий момент) гемагглютинина VlhA индуцирует переключение [Markham et al., 1998].

В настоящей работе мы показали, что изменение числа GAA-повторов происходит неслучайно, а согласно определенному алгоритму. В частности, смена репертуара VlhA происходит синхронизированно у нескольких клональных популяций независимо друг от друга по одной последовательности. Таким образом, смена мажорного гемагглютинина VlhA происходит по итеративному алгоритму (циклу) в рамках виртуальной очереди (таблице псевдослучайных чисел). Порядок

в очереди определяется числом ГАА-повторов. Число ГАА-повторов при этом играет роль переменной цикла. При этом следующим кандидатом на смену является тот антиген, на который дольше всего не было иммунной атаки. Также были найдены белки, участвующие в считывании числа ГАА-повторов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-74-10105 «Роль структуры хроматина минимальной клетки в поддержании гомеостаза протеома домашнего хозяйства».

Литература

Liu L. et al. GAA trinucleotide repeat region regulates M9/pMGA gene expression in *Mycoplasma gallisepticum* // Infect. Immun. 2000. Vol. 68, № 2. P. 871–876.

Markham P. F. et al. Expression of two members of the pMGA gene family of *Mycoplasma gallisepticum* oscillates and is influenced by pMGA-specific antibodies // Infect. Immun. 1998. Vol. 66, № 6. P. 2845–2853.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА ДЕЙСТВИЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА (КУМЫС) НА ВОЗМОЖНОСТЬ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ТРАНСЛОКАЦИИ ПРИ АНТИБИОТИК-ИНДУЦИРОВАННОМ ДИСБИОЗЕ У МЫШЕЙ – ГИБРИДОВ F1

Ю. Н. Хомяков¹, Т. И. Хомякова²
А. Д. Магомедова², В. А. Мхитаров²

¹ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
e-mail: Khomyakov@cmd.su

²ФГБНУ НИИ морфологии человека им ак. А. П. Авцына
Москва, e-mail: tatkhom@yandex.ru

Показано, что нарушение барьерной функции кишечника лежит в основе патогенеза различных аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая синдром раздраженного кишечника, целиакию, аутоиммунный гепатит, сахарный диабет 1 типа, рассеянный склероз и системную красную волчанку [Mu et al., 2017]. Показано, что дисбиоз и транслокация бактерий отмечается у пациенток с преэклампсией. В плаценте пациенток с преэклампсией были значительно повышены общее количество бактерий, фузобактерий и уровни воспалительных цитокинов [Chen et al., 2020]. В серии экспериментов на аутбредных и инбредных мышах нами было обнаружено, что антибиотик-индуцированный дисбиоз может служить причиной транслокации бактерий с резорбцией плода, приводить к рождению нежизнеспособного потомства или обсеменению органов, что после перевода

на самостоятельное питание обуславливает развитие интерстициальной пневмонии. В значительном числе публикаций постулируется безусловный эффект превентивного и терапевтического действия пробиотиков и кисломолочных продуктов при употреблении антибиотиков [Кайбышева, Никонов, 2019], в частности, предлагается употреблять кумыс, обогащенных лактобациллами и бифидобактериями [Алексеева и др., 2018].

Целью настоящего исследования была оценка возможностей превентивного действия кумыса, обогащенного штаммом ацидофильных лактобацилл *Lactobacillus acidophilus* К 3 111 24 из коллекции ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» (ГосНИИгенетика). Исследование проводили на беременных мышках-самках, гибридах 1 поколения F1 (СВАхС57В1/6), N = 18. Беременные мыши содержались по 6 голов в одной клетке со стандартным кормом, питьевой водой, освещением и сменой подстила в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009) и ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами», в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. Животные были разделены на три группы по 6 голов в группе. На 12–15 дни беременности (что соответствует началу третьего триместра беременности у человека) мышам опытных групп в течение трех дней однократно инъекционно вводили препарат цефотаксим в дозе 1,5 мг/сут. Мыши группы Опыт 1 по достижении дисбиотического состояния, как и мыши контрольной группы, содержались на стандартном рационе. Мышам группы Опыт 2 вместо воды давали кумыс, приготовленный из коровьего молока 1%-ной жирности с использованием сухой кумысной закваски (ГОСТ10382-85) и обогащенный добавлением бактериальной суспензии *L. acidophilus* К 3 111 24 с конечным содержанием ацидофильных лактобацилл *L. acidophilus* – $5 \cdot 2 \cdot 10^7$ КОЕ/г, pH 3,5. Достижение состояния дисбиоза регистрировалось по снижению в фекалиях уровня лактобацилл ниже 10^3 КОЕ/г при посеве на среду MSR (Hi-Media Индия) у мышей первой опытной группы. При этом уровень лактобацилл в фекалиях контрольной группы составлял $1,5 - 2 \cdot 10^5$ КОЕ/г, а во второй опытной группе – $2,2 - 3 \cdot 10^4$ КОЕ/г. После рождения потомство находилось вместе с матерями до окончания подсосного периода и еще 28 дней содержалось на стандартном рационе после перехода на самостоятельное питание, после чего было выведено из эксперимента. Для дальнейшего микробиологического ана-

лиза использовались правые каудальные доли легкого, для гистологического исследования брали образцы легкого, фиксировали их в нейтральном 10%-ном формалине с последующей стандартной проводкой, изготовлением срезов и окраской гематоксилином и эозином.

Результаты. Потомство всех групп мышей-гибридов F1 было жизнеспособным и активным, внешних признаков патологии не имело вплоть до момента выведения из эксперимента. Общее количество потомства в первой опытной группе составило 44 головы, во второй опытной группе – 48 голов, в группе контроля – 42 головы. Рожденные мышата в опытных группах не отличались от мышат контрольной группы. Фекалии у потомства всех групп были без признаков дисбиоза, оливкового цвета, нормальной консистенции. По массе тела животные первой опытной группы достоверно отличались от контроля, имело сниженную активность и аппетит, шерсть была тусклой и взъерошенной. Потомство второй группы не отличалось по массе и внешнему виду от группы контроля. Тем не менее, при посеве гомогената образца легких всех животных – потомства первой опытной группы был обнаружен активный рост микроорганизмов на агаре Лурия Бергана в аэробной среде при 37 °С в количестве 300 до 500 КОЕ/г, в то время как из образцов легких ни в одном случае не было выявлено роста на плотной питательной среде. При посеве гомогената образца легких потомства второй опытной группы бактериальный рост был обнаружен в количестве 220–300 КОЕ/г у 40 из 48 животных. Гистологически было подтверждено развитие интерстициальной пневмонии с формированием воспалительных очагов в легких у всех животных обеих опытных групп, при этом при морфометрическом анализе воздушности легких суммарная площадь свободных альвеол у потомства второй группы, у которых была выявлена бактериальная обсемененность легких, статистически достоверно была выше по сравнению с контролем и опытной группой, что говорит о более выраженном повреждении ткани, вопреки предположению о превентивной роли употребления кумыса при приеме антибиотиков.

Таким образом, применение пробиотиков в виде кисломолочного продукта при необходимости употребления антибиотиков на поздних сроках беременности не может быть рекомендовано вне индивидуальных особенностей организма. Более того, применение напитков с низким рН может привести к повышению проницаемости кишечного барьера и более выраженной транслокации бактерий в отдаленные локусы организма, в том числе к плоду.

Литература

Алексеева Н. В., Минеев Е. В., Махмудова Ш. Ш. Кумыс с добавлением пробиотических культур *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium* spp. // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4, № 4. С. 212–220.

Кайбышева В. О., Никонов Е. Л. Пробиотики с позиции доказательной медицины // Доказательная гастроэнтерология. 2019. Т. 8, № 3. С. 45–54. <https://doi.org/10.17116/dokgastro20198031>

Chen X., Li P., Liu M., Zheng H., He Y., Chen M. X., Tang W., Yue X., Huang Y., Zhuang L., Wang Z., Zhong M., Ke G., Hu H., Feng Y., Chen Y., Yu Y., Zhou H., Huang L. Gut dysbiosis induces the development of pre-eclampsia through bacterial translocation // Gut. 2020. Vol. 69, № 3. P. 513–522. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319101>

Mu Q., Kirby J., Reilly C. M., Luo X. M. Leaky gut as a danger signal for autoimmune diseases // Front Immunol. 2017. Vol. 8. P. 598. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00598>

ВЫБОР МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ В ОРГАНИЗМЕ БЕРЕМЕННЫХ КАК ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ

Т. И. Хомякова^{1,2}, А. В. Федорова³, А. Д. Магомедова¹,
Ю. Н. Хомяков⁴

¹ФГБНУ НИИ морфологии человека им ак. А. П. Авцына, Москва
e-mail: tatkhom@yandex.ru

²ООО «НИТЦ ПРИМ» (Обнинск, Калужская обл.)

³МРНЦ им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России
e-mail: ledifav@yandex.ru

⁴ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
e-mail: Khomyakov@cmd.su

Феномен бактериальной транслокации (БТ) через кишечную стенку с последующим гематогенным и лимфогенным распространением был обнаружен почти 100 лет назад [Jager et al., 2013], однако наибольший интерес к нему возник в последние десять лет в связи с доказанным его участием в патогенезе постоперационного сепсиса [O'Boyre et al., 1998], патологии гепатобилиарной системы и поджелудочной железы [Matthew, 2012] и др. Актуальность исследования БТ в последние годы возросла в связи с ростом частоты развития пневмонии новорожденных и раннего неонатального сепсиса [Procianoy, Silveira, 2020]. Большинство авторов полагает, что причиной развития этих заболеваний являются недоношенность и связанные с этим дефекты иммунной защиты и кишечных барьерных механизмов самого ребенка, в то время как существует ряд клинических и экспериментальных подтверждений важнейшей роли БТ в патогенезе

инфекционных заболеваний новорожденных [Savion, 2000]. В лаборатории молекулярной микробиологии и инфекционной патологии ФГБНУ НИИ морфологии человека еще в 2005 г. было показано, что БТ из кишечника беспородных беременных мышей, развившаяся вследствие дисбиоза, индуцированного применением антибиотиков цефалоспоринового ряда, приводит к резкому повышению частоты и выраженности интерстициальной пневмонии у потомства. При этом резкое ухудшение состояния происходит при переходе мышат к самостоятельному питанию. Этот феномен требует дальнейшего тщательного исследования, в связи с чем необходимо разработать достоверную и достаточно дешевую модель. В упомянутых выше исследованиях были использованы аутбредные мыши, имеющие высокую гено- и фенотипическую вариабельность. Целью данной работы был изучение влияния цефотаксима на течение беременности и состояние здоровья новорожденных аутбредных и инбредных мышей.

Материалы и методы: аутбредные белые мыши, половозрелые самки 12 голов, мыши линии Balb/c, половозрелые самки 12 голов, мыши линии C57Bl6, 12 голов, межлинейные гибриды первого поколения F1, 10 голов. Выбор линий был обусловлен тем, что мыши линии C57Bl6 и Balb/c имеют генетически обусловленный преимущественный Th1 и Th2 иммуногенотип (соответственно). Проведение исследований на двух линиях мышей позволяет оценить вклад клеточного и гуморального звеньев иммунитета в изучаемый процесс. Применение генетически и фенотипически однородных гибридов первого поколения повышает вероятность получения статистически более достоверных результатов, чем эксперименты на беспородных мышах, поскольку ответ организма гибридов на экспериментальное воздействие однотипный и стабильный.

Беременность мышей достигалась стандартным методом подсаживания к ним самцов той же линии в отношении 1 самец: 6 самок на 5–7 дней, после чего самцы удалялись из клеток. Беременные мыши содержались по 6 голов в одной клетке со стандартным кормом, питьевой водой, освещением и сменой подстилки в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009) и ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами», в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. Были сформированы по две группы мышей каждой линии и нелинейных животных (опыт и контроль) по 6 мышей в каждой группе. На 12–15 дни беременности (что соответствует началу треть-

его триместра беременности у человека) мышам опытных групп в течение трех дней однократно инъекционно вводили препарат цефотаксим в дозе 1,5 мг/сут. Достижение состояния дисбиоза регистрировалось по снижению в фекалиях уровня лактобацилл ниже 10^3 КОЕ/г при посеве на среду MSR (Hi-Media Индия) и увеличению количества условно-патогенных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp.) при посеве на агар Луриа–Бертани (LA). За животными наблюдали в течение оставшегося срока беременности, регистрировали количество новорожденных мышат, их состояние в течение подсосного периода.

Результаты. При наличии характерных признаков беременности у всех мышей до введения антибиотика благополучное родоразрешение имело место у всех мышей всех контрольных групп, а также у белых беспородных мышей и у мышей – гибридов 1 поколения. Количество новорожденных составляло от 8 до 12 голов в одном гнезде, в течение подсосного периода и последующих двух недель все мышата были внешне здоровыми, подвижными, шерстный покров – гладкий, фекалии имели вид равномерно окрашенных светло-коричневых болюсов, без признаков патологии. Среди опытных групп у животных линии C57Bl/6 было отмечено рождение потомства (2 головы) только у одной самки, в то время как у остальных четырех имела место резорбция плода. Механизм резорбции у мышей при введении антибиотиков цефалоспоринового ряда описан в ряде работ и обусловлен повышением усилением продукции Th1 цитокинов [Savion et al., 2000]. У мышей Balb/C было отмечено рождение 2 (три случая), 3 (два случая) и 5 мышат, однако уже в течение подсосного периода все мышата выглядели слабыми и погибли и/или были съедены самками, что является обычной поведенческой реакцией в случае рождения нежизнеспособного потомства. Потомство опытных групп мышей-гибридов F1, как и аутбредных белых мышей, в количестве от 3 до 10 голов было жизнеспособным и активным, внешних признаков патологии не имело вплоть до момента выведения из эксперимента. Таким образом, исследование эффекта БТ на протекание и исход беременности, а также развитие патологических процессов у новорожденных, потенциально связанных с БТ может быть проведено на гибридах F1 как более однородных генотипически по сравнению с аутбредными мышами, но более устойчивых к воздействию по сравнению с линейными животными.

Литература

Haddad F. C., Rao R., Kaur S., Redkey J., Karcz A., Ladd A. P. The implication of intestinal bacterial translocation in central line associated blood stream infections in the pediatric population // J Pediatr Surg. 2020. Vol. 55, № 8. P. 1651–1654. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2020.02.012>

Jager S., Stange E. F., Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease // *Langenbecks Arch Surg.* 2013 Vol. 398, № 1. P. 1–12.

O'Boyle J., MacFie J., Mitchell C. J., Johnstone D., Sagar P. M., Sedman P. C. Microbiology of bacterial translocation in humans // *Gut.* 1998. Vol. 42. P. 29–35.

Procianny R. S., Silveira R. C. The challenges of neonatal sepsis management // *J. Pediatr (Rio J).* 2020. Vol. 96. Suppl. 1. P. 80–86.

Savion S., Blank M., Shepshelovich J., Fishman P., Shoenfeld Y., Toder V. Ciprofloxacin affects pregnancy loss in CBA/JxDBA/2J mice possibly via elevation of interleukin-3 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor production // *Am J Reprod Immunol.* 2000 Vol. 44, № 5. P. 293–298.

Weiss M. J. Cytokines in liver, biliary, and pancreatic disease // *Blumgart's Surgery of the Liver, Pancreas and Biliary Tract (Fifth Edition)* / Editor(s): W. R. Jarnagin, L. H. Blumgart. 2012. P. 166–180.

ОЦЕНКА ПРЕВЕНТИВНОГО ЭФФЕКТА ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ АНТИБИОТИК-ИНДУЦИРОВАННОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ БАКТЕРИЙ ИЗ КИШКИ МАТЕРИ В ЛЕГКИЕ ПОТОМСТВА

Т. И. Хомякова¹, Ю. Н. Хомяков², В. А. Мхитаров¹
А. В. Алешкин³, Э. Р. Зулкарнеев³, А. Д. Магомедова¹

¹ФГБНУ НИИ морфологии человека им ак. А. П. Авцына, Москва
e-mail: tatkhom@yandex.ru

²ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
e-mail: Khomyakov@cmd.su

³ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора
e-mail: elzz89@mail.ru

Феномен бактериальной транслокации является общепризнанным феноменом как у человека, так и у животных и рассматривается как механизм развития так называемых «инфекций кишечного происхождения» (Gut-derived infections, GDIs) у лиц, перенесших травму, обширные ожоги, хирургическое вмешательство, острый панкреатит и т. д. Показано, что GDI может привести к сепсису и синдрому полиорганной недостаточности, которые становятся причиной смерти. GDIs обусловлены снижением иммунореактивности организма при гипертранслокации кишечных бактерий и эндотоксинов вследствие нарушения функции кишечного барьера. Такое нарушение, в частности, имеет место при антибиотик-индуцированном тяжелом дисбиозе. В предыдущих исследованиях в лаборатории молекулярной микробиологии ФГБНУ НИИ МЧ было установлено, что частой причиной бактериальных осложнений у ВИЧ-больных является *Klebsiella pneumoniae*, ведущая происхождение из толстой кишки большого, по меньшей мере, в 50 % случаев летальной пневмонии

[Хомякова, 2019]. Показано, что новорожденный при рождении подвергается воздействию широкого спектра бактериофагов, что обеспечивает иммунологическую и метаболическую толерантность в более позднем возрасте [Vitetta et al., 2018]. Опосредованный бактериофагами контроль микробиома при колонизации разных эпителиев организма, способствует развитию свойств, которые помогают создавать симбионтные популяции, снижающие риск инфекционных заболеваний [Carding et al., 2017]. Известно также, что бактериофаги оказывают воздействие на кишечный барьер, снижая его проницаемость, а также связаны с функциями мукозального иммунитета человека [Manrique et al., 2016]. Целью исследования была проверка гипотезы о возможном протективном воздействии перорального употребления поливалентных фагов, активных в отношении *Klebsiella spp.*, ранее выделенных из фекалий беременных самок.

Материалы и методы: межлинейные гибриды первого поколения F1 половозрелые самки, N = 18, с массой тела 180–200 г. Беременные мыши содержались по 6 голов в одной клетке со стандартным кормом, питьевой водой, освещением и сменой подстилки в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие Приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009) и ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами», в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. Были сформированы три группы мышей (опыт 1, опыт 2 и контроль). На 12–15 дни беременности (что соответствует началу третьего триместра беременности у человека) мышам опытных групп инъекционно вводили препарат цефотаксим в дозе 1,5 мг/сут. Животным 2 опытной группы перорально вводили коктейль из четырех вирулентных клебсиеллезных бактериофагов в объеме 0,1 мл с титром каждого фага не менее 10^8 БОЕ/мл, вплоть до родоразрешения. В возрасте 1 месяца, когда мышата были способны перейти на самостоятельное питание, потомство находилось в условиях стандартного содержания 28 сут. Мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации, определяли общую бактериальную нагрузку посевом гомогената правой каудальной доли легкого в физиологическом растворе путем стандартных десятичных разведений. Для гистологического исследования отбирали левое легкое, фиксировали в растворе Буэна, через 24 ч отмывали в 70 % этиловом спирте, дальнейшую проводку, изготовление гистологических срезов и окраску гематоксилином и эозином проводили стандартными методами. Морфометрическая обработка проводилась с помощью программы Image-Pro Premier 3D V 9.1 (Media Cybernetics).

Результаты. По истечении срока беременности количество мышат в потомстве 1 опытной группы составляло 3–10 голов и 10–12 голов во 2 опытной группе против 8–12 голов в контрольной группе. На 28 сутки после перевода на самостоятельное питание внешних выраженных различий между группами не было, однако масса тела у мышшей 1 опытной группы была ниже по сравнению с мышшами 2 опытной группы и контроля. В образцах легких потомства контрольной группы не было обнаружено в определяемом количестве бактерий, способных расти на среде Лурия-Бертиани (HiMedia, Индия). В образцах легких обеих опытных групп были обнаружены бактерии в значительном количестве (от 300 до 500 КОЕ/г в группе Опыт 1 и от 110 до 200 КОЕ/г в группе Опыт2) при том что в контрольной группе количество бактерий было ниже определяемого уровня. При гистологическом исследовании были обнаружены очаги воспаления, характеризовавшиеся очагами воспалительного инфильтрата с повышением воздушности легких. При морфометрической оценке относительной доли площади, занимаемой очагами воспаления и площади просветов альвеол, было обнаружено, что при отсутствии различия в степени выраженности воспалительного процесса у потомства мышшей, которым при введении антибиотика и далее до родоразрешения перорально вводили клебсиеллезные фаги, состояние альвеол было достоверно более сохранно.

Таким образом, применение клебсиеллезного коктейля фагов матерью, вынужденной принимать антибиотики, может оказывать превентивное действие, снижающее вероятность обсеменения легких у плода и последующего воспаления легких у новорожденного.

Литература

- Хомякова Т. И., Козловская Г. В., Магомедова А. Д., Чертович Н. Ф., Козловский Ю. Е., Пархоменко Ю. Г., Хомяков Ю. Н. Роль кишечного микробиома в развитии ВИЧ/СПИД-инфекции // Молекулярная медицина. 2019. Т. 17, № 5. С. 12–22.
- Carding S. R., Davis N., Hoyles L. Review article: the human intestinal virome in health and disease // *Aliment Pharmacol Ther.* 2017. Vol. 46:800. P. 15. <https://doi.org/10.1111/apt.14280>
- Manrique P., Bolduc B., Walk S. T., Van der Oost J., de Vos W. M., Young M. J. Healthy human gut phageome // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016. Vol. 113. P. 10400–10405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601060113>
- Vitetta L., Vitetta G., Hall S. Immunological tolerance and function: associations between intestinal bacteria, probiotics, prebiotics, and phages // *Front Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 2240. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02240>

ПОЛИМОРФИЗМ ГРИБОВ *LECANICILLIUM* И *AKANTHOMYCES* (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES, CORDYSPITACEAE), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НАСЕКОМЫХ И РЖАВЧИННЫХ ГРИБОВ

М. А. Черепанова¹, А. А. Чоглокова²
Б. А. Борисов³, Г. В. Митина⁴

¹Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого
Санкт-Петербург, e-mail: CherepMA@mail.ru

²Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, e-mail: 4oglik@inbox.ru

³ООО «АгроБиоТехнология», Москва, e-mail: borborisov@mail.ru

⁴Всероссийский институт защиты растений
Санкт-Петербург, e-mail: galmit@rambler.ru

Энтомопатогенные грибы (ЭГ) из родов *Lecanicillium* и *Akanthomyces* имеют широкий круг хозяев. Они встречаются на нематодах, клещах, пауках и насекомых, среди которых преобладают представители отряда Hemiptera (тли, белокрылки, медяницы, цикадовые, кокциды – опасные вредители различных растений). В отсутствие подходящих хозяев-беспозвоночных они могут быть гиперпаразитами ржавчинных грибов (Pucciniomycetes) [Askary et al., 2007]. Антагонистические и гиперпаразитические свойства этих ЭГ выявлены по отношению и к другим фитопатогенам, вызывающим такие болезни как мучнистая роса, фузариозы, бактериальные пятнистости и различные гнили сельскохозяйственных растений [Чоглокова и др., 2020]. Кроме того *Lecanicillium* – подобные грибы могут проникать в ткани растений и проявлять себя как эндофиты, способствующие повышению иммунитета растения к возбудителям болезней [Nicoletti et al., 2020].

В работе было изучено генетическое разнообразие 14 природных изолятов *Lecanicillium*-подобных грибов, выделенных в Московской, Белгородской, Мурманской областях, Краснодарском крае, респ. Адыгея. Из них 11 выделено из насекомых отрядов Hemiptera и Coleoptera, 3 – из ржавчинных грибов. Среди тех и других был обнаружен вид *Ak. muscarius* (7 изолятов из насекомых и 2 из ржавчинных грибов), 3 представителя вида *Ak. lecanii* – из кокцид. Также было определено два близкородственных вида: *Simplicillium lamellicola* (из тли и из пустул ржавчинного гриба, Краснодарский край) и *S. lanosniveum* (из ржавчинных грибов).

Изоляты были молекулярно охарактеризованы по участкам трех генных локусов: митохондриального гена *nad1*, фактора элонгации 1-альфа (EF1- α) [Mitina et al, 2017] и локуса ITS [Kouvelis et al., 2008].

Исследование показало, что изоляты, идентифицированные нами как *Ak. muscarius* могут быть отнесены к трем молекулярным гаплотипам. Изолят Ак 6, выделенный из цикадки (Адыгея), отличался от всех остальных. В локусе ITS Ак 6 обнаружено 10 нуклеотидных замен и в локусе EF1- α 5 замен, что позволяет сделать предположение о его принадлежности к новому виду. В то же время по локусу *nad1* он совпал с гаплотипом С вида *Ak. muscarius* (= *L. muscarium*), описанным ранее [Mitina et al., 2017], который также был выделен на юге Краснодарского края. Полученные данные необходимо дополнить изучением других локусов.

Молекулярные профили изолятов *Ak. muscarius*, выделенных из насекомых и ржавчинных грибов были идентичны и относились к гаплотипу А [Mitina et al., 2017]. Также из ржавчинных грибов был выделен изолят, отнесенный к виду *S. lanosoneum*, но так как он крайне близок к *Akantomices* sp., то необходимо проводить дальнейшие исследования для более точной идентификации.

Внутри вида *Ak. lecanii* также выявлен полиморфизм. По локусам *nad1* и EF1- α штамм Ак 2 (Краснодарский край) отличался от других представителей данного вида одной нуклеотидной заменой. По локусу ITS обнаружена делеция и две замены.

Таким образом, было идентифицировано 14 изолятов, выявлен полиморфизм внутри определенных нами видов. Установлено, что вид *Ak. muscarius* генетически не изменяется по изученным локусам при смене хозяина из хозяев разных макротаксонов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-016-00241.

Литература

- Чоглокова А. А., Митина Г. В. Антибиотическая активность штаммов гриба *Lecanicillium muscarium* в отношении возбудителей болезней растений // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. 2020. С. 225–226
- Askary H., Yarmand H. Development of the entomopathogenic hyphomycete *Lecanicillium muscarium* (*Hyphomycetes: Moniliales*) on various hosts // Eur. J. Entomol. 2007. Vol. 104. P. 67–72.
- Kouvelis V. N., Sialakouma A., Typas M. A. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species // Mycological Research. 2008. Vol. 112, N 7. P. 829–844. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.016>
- Mitina G, Kazartsev I, Vasileva A, Yli-Mattila T. Multilocus genotyping based species identification of entomopathogenic fungi of the genus *Lecanicillium* (= *Verticillium lecanii* s.l.) // J. Basic Microbiol. 2017. P. 1–12. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700092>
- Nicoletti, R., Becchimanzi A. Endophytism of *Lecanicillium* and *Akanthomyces* // Agriculture 2020. Vol. 10, N 6. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060205>

ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОМ КАК ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНДИКАТОР: ДИНАМИКА МИКРОБИОМА ПРИДОРОЖНЫХ ПОЧВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТИВОГОЛОЛЕДНЫХ СМЕСЕЙ

Н. А. Шашков¹, Н. Курчак², О. В. Орлова³, А. А. Кичко³,
А. Г. Пинаев³, Е. Е. Андронов^{3,4,5}

¹Санкт-Петербургский государственный университет телекоммуникаций
им. проф. М. А. Бонч-Бруевича, Санкт-Петербург, e-mail: nikosha000@gmail.com

²Санкт-Петербургский государственный аграрный университет
Санкт-Петербург, e-mail: nick.kurchak@gmail.com

³Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии
Санкт-Петербург, e-mail: eeandr@gmail.com

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

⁵Почвенный институт им. В. В. Докучаева, Москва

Одним из основных трендов в экологических исследованиях в XXI в. стало активное использование систем высокопроизводительного секвенирования для анализа природных микробиомов, ставших в последнее время одним из самых перспективных биоиндикаторов экологического состояния окружающей среды [Першина и др., 2004]. По причине того, что микробное сообщество почвы обладает исключительно высокой численностью (до нескольких млрд микроорганизмов на 1 г почвы) и очень высоким таксономическим и функциональным разнообразием (до десятков тыс. видов на 1 г почвы), это сообщество чрезвычайно отзывчиво к воздействиям физических, химических, биологических и климатических факторов, проявляющихся в изменениях численностей отдельных таксономических групп. До самого последнего времени использование индикаторного потенциала природных микробиомов было ограничено анализом их культивируемого компонента, который, как теперь понятно, составляет не более 1–5 % от общей численности природных микробиомов, так как их большая часть является «некультивируемыми». Однако с развитием систем высокопроизводительного секвенирования, основанных на секвенировании ДНК, выделенной из окружающей среды, ситуация радикально изменилась. Сейчас для анализа динамики, вызванной воздействием различных факторов, доступна вся полнота микробиомов, включая самые малочисленные таксоны с относительной численностью до 10^{-4} – 10^{-5} . В различных работах, использующих анализ почвенной ДНК, была показана ясная связь таксономической структуры почвенного микробиома с воздействием различных факторов природного и антропогенного характера [Першина и др., 2016], загрязнения

почв нефтепродуктами [Журавлева и др., 2017] и естественного засоления [Першина и др., 2012; Андронов и др., 2012]. Во всех случаях было показано, что возможно выявление микробных таксонов, специфически отзывающихся на тот или иной фактор, и имеющих характер биоиндикаторов, перспективных для качественного и количественного анализа экологических сдвигов, вызванных воздействием этих факторов.

В настоящей работе объектом исследования стали сдвиги в таксономической структуре микробиомов придорожных почв, систематически подвергающихся воздействию противогололедных смесей. В рамках настоящего исследования были проанализированы образцы почв, отобранных осенью 2021 г. на газоне, прилегающем к Пулковскому шоссе г. Санкт-Петербурга. Всего было отобрано 3 образца почвы в непосредственной близости от шоссе, 3 образца на расстоянии 10 м и 3 образца на расстоянии 100 м. В каждом образце были проанализированы электропроводность и ионный состав (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-}) с использованием пламенного фотометра. Было показано, что засоление вызвано в основном хлоридом натрия, а его концентрация при приближении к шоссе возрастает почти в 40 раз (от 1,5 до 60 мг/100 г почвы, в водной вытяжке).

Из каждого из 9 образцов почвы было отобрано по 6 технических повторностей для выделения ДНК. Далее были приготовлены ампликонные библиотеки по гену 16S рРНК с использованием праймеров, фланкирующих участок V4 данного гена, которые были просеквенированы с использованием прибора Illumina MiSeq с выходом не менее 20 тыс. нуклеотидных последовательностей на образец. Всего было проанализировано 54 библиотеки с общей численностью более 1 млн последовательностей. Таксономический анализ, проведенный с использованием стандартных средств выявил более 400 доминирующих сиквенса-вариантов (ASV), принадлежащих к основным филам, обычным для почвенных микробиомов: неклассифицируемым (около 50 %), *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Acidobacteriota* и около 10 минорных фил, включая археи. Распределение таксонов, идентифицированных на уровне рода, в 54 образцах представлено на рис. 1. Анализ бета-разнообразия, выполненный с использованием взвешенной метрики UniFrac, представлен на рис. 2.

Из приведенных данных очевидно, что в проанализированных образцах выявлена ясная дифференциация образов, связанная, по всей видимости, с удаленностью от шоссе и, как следствие с концентрацией солевых компонентов противогололедных смесей. Более детальный статистический анализ позволил выявить две группы таксонов-индикаторов – 25 «позитивных» (чья относительная численность

возрастает при повышении концентрации соли в 10-500 раз) и 50 «негативных» (относительная численность снижается в 10-500 раз). Весьма интересно, хотя и не удивительно, что в числе позитивных индикаторов выявлены известные таксоны, часто приуроченные к местообитаниям с повышенной концентрацией солей, такие как *Halogramum*, *Glycomyces*, *Marivirga*, *Gramella*, *Halobacillus*, *Salinimicrobium*, *Vitellibacter*, *Halomonas* и многие другие. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале микробного сообщества почв как биоиндикаторов в экологических исследованиях.

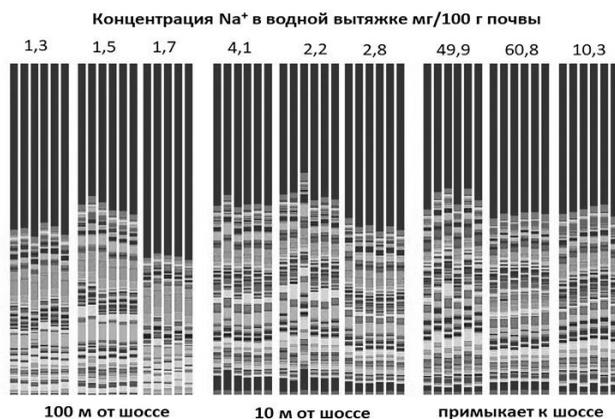


Рис. 1. Таксономическая структура почвенных микробиомов на уровне родов в зависимости от удаленности от шоссе и концентрации соли

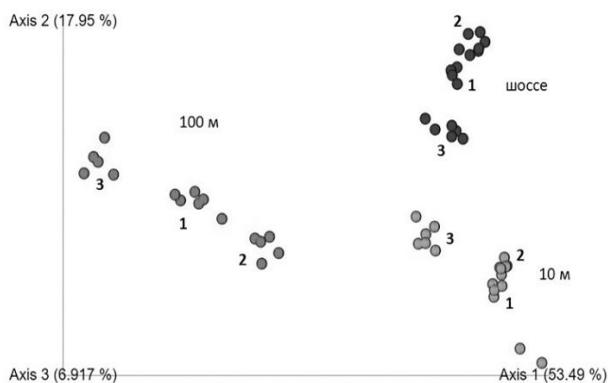


Рис. 2. Анализ бета-разнообразия (взвешенный UniFrac) микробных сообществ образцов почв, таксономические структуры которых представлены на рис. 1

Литература

Андронов Е. Е., Петрова С. Н., Пинаев А. Г., Першина Е. В., Рахимгалиева С. Ж., Ахмеденов К. М., Горобец А. В., Сергалиев Н. Х. Изучение структуры микробного сообщества почв разной степени засоления с использованием t-RFLP и ПЦР с детекцией в реальном времени // Почвоведение. 2012. № 2. С. 173.

Журавлева А. С., Лабутова Н. М., Андронов Е. Е. Влияние нефтезагрязнения на микробоценоз почв, прилегающих к нефтехранилищу // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 4. С. 60–68.

Першина Е. В., Кутовая О. В., Когут Б. М., Андронов Е. Е. Основные достижения и перспективы почвенной метагеномики. СПб.: Информ-Навигатор. 2004. 288 с.

Першина Е. В., Иванова Е. А., Нагиева А. Г., Жиенгалиев А. Т., Чирак Е. Л., Андронов Е. Е., Сергалиев Н. Х. Сравнительный анализ микробиомов природных и антропогенно-нарушенных почв Северо-западного Казахстана // Почвоведение. 2016. № 6. С. 720–732.

Першина Е. В., Тамазян Г. С., Дольник А. С., Пинаев А. Г., Сергалиев Н. Х., Андронов Е. Е. Изучение структуры микробного сообщества засоленных почв с использованием высокопроизводительного секвенирования // Экологическая генетика. 2012. Т. 10, № 2. С. 32–40.

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КАК ОДНА ИЗ ФОРМ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ *RHODOCOCCLUS QINGSHENGII* VKM Ac-2784D

Ю. А. Маркова¹, Л. А. Беловежец^{1,2}, А. С. Мориц¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

² Иркутский институт химии им. Фаворского СО РАН, Иркутск
e-mail: juliam06@mail.ru

Наиболее хорошо изученное взаимодействие бактерий с биологически активными соединениями – это взаимодействие с антибиотиками. Известно, что устойчивость бактерий к антибиотикам обусловлена не только генетической, но и фенотипической резистентностью, которая связана с изменением метаболизма микробной клетки в результате действия факторов внешней среды [Schrader et al., 2020]. Показано, что бактерицидные антибиотики, независимо от их химической структуры, активируют центральный метаболизм углерода. Это приводит к накоплению НАДН и гиперактивации ЭТЦ. В результате в клетке образуется высокое количество АФК, которое увеличивает токсическое действие антибиотика. Поэтому, источники углерода, ускоряющие метаболизм (некоторые аминокислоты, гексозы и др.) приводят к росту антибиотикочувствительности бактерий [Ye et al., 2018]. Напротив, жирные кислоты и алканы, замедляющие метаболизм, способствуют большей выживаемости. Таким образом, манипуляция с составом среды может усилить или ослабить действие микробного препарата.

Однако неизвестно распространяется ли вышеуказанное явление на взаимодействие бактерий с другими биологически активными соединениями, не обладающими антимикробной активностью. Целью представленной работы было установить влияние ряда природных и химически синтезированных веществ на *Rhodococcus qingshengii* VKM AC-2784D, культивируемый в жидкой минеральной среде 8E с добавлением разных источников углерода.

Объекты и методы исследования. *R. qingshengii* VKM AC-2784D был выделен из нефтезагрязненных почв в районе пос. Тыреть, Иркутской области. Данный микроорганизм является эффективным нефтедеструктором и способен снижать негативное действие углеводородов нефти на растения. В качестве биологически активных соединений использовали колхицин (Sigma), триэтаноламин и протатраны на его основе, синтезированные в ИрИХ СО РАН, гентамицин и анавидин. Эксперименты проводили на средах МПБ (Оболенск) и 8E с глюкозой, нафталином или инозитом (5 г/л) в качестве единственного источника или без углерода (голодная среда). Оценивали скорость роста и биопленкообразование в динамике, активность дегидрогеназных ферментов, количество АФК и др.

Результаты. Установлено, что природа источника углерода оказывает существенное воздействие на силу и характер влияния исследуемых биологически активных соединений на *R. qingshengii* VKM AC-2784D. Внесение гентамицина в среду культивирования родококка приводило к активации клеточных дегидрогеназ и появлению АФК, что соответствует наблюдениям других авторов [Imlay, 2013]. При этом, амплитуда и динамика дегидрогеназной активности на средах с глюкозой, инозитом, нафталином и голодной различались.

Колхицин и протатраны также стимулировали активность дегидрогеназ, особенно у бактерий, культивируемых на среде с глюкозой, что свидетельствует об активации центрального метаболизма углерода. Вероятно, именно это является причиной увеличения скорости роста бактерий и угнетения биопленкообразования.

Неблагоприятное воздействие исследуемых веществ (за исключением анавидина) на бактерии, культивируемые в среде с нафталином, возможно, является следствием избыточного накопления АФК не только в результате действия данных веществ, но и в результате деструкции нафталина [Сазыкин и др., 2009].

Таким образом, мы предполагаем, что некоторые биологически активные соединения, оказывающие стимулирующее воздействие на микроорганизмы, также как и бактерицидные антибиотики активируют центральный метаболизм углерода. Это способствует ускорению их роста и, вероятно, снижению биопленкообразования.

Литература

Schrader S. M., Vaubourgeix J., Nathan C. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it // Science translational medicine. 2020. Vol. 12. P. 549. eaaz6992.

Ye J. et al. Alanine enhances aminoglycosides-induced ROS production as revealed by proteomic analysis // Frontiers in microbiology. 2018. Vol. 9. P. 29.

Imlay J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium // Nature Reviews Microbiology. 2013. Vol. 11, № 7. P. 443–454.

Сазыкин И. С., Чистяков В. А., Сазыкина М. А. Ферментативные и неферментативные механизмы деградации углеводов нефти микроорганизмами // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2009. №. 21. С. 50–57.

СЕКЦИОННЫЕ ДОКЛАДЫ

РИЗОБИИ С ИЗМЕНЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗАХ

З. Р. Вершинина, А. М. Лавина
О. В. Чубукова, Л. Р. Хакимова, А. Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, e-mail: zilyaver@mail.ru

На сегодняшний день существует достаточно много исследований, посвященных роли экзополисахаридов (ЭПС) в становлении бобово-ризобиального симбиоза. Тем не менее до полного понимания функций ЭПС в формировании и функционировании симбиотических систем еще далеко. Было показано, что качество и количество полисахаридов, особенно ЭПС и липополисахаридов, вырабатываемых ризобиями, могут влиять как на их агглютинацию этих бактерий, так и на образование биопленок на поверхности корней растений, что играет решающую роль на начальных этапах симбиоза [Vogino et al., 2013]. Также было найдено, что ЭПС принимают участие в различных этапах развития инфекционной нити, бактериоидов и подавлении иммунного ответа растения-хозяина [Kelly et al., 2013]. Выявлено положительное влияние штамма *R. leguminosarum*, которые вырабатывал большее количество экзополисахарида с более высокой степенью полимеризации, чем штамм дикого типа, на биомассу растений клевера

[Marczak et al., 2013]. Существует несколько работ, которые были посвящены специфичности бобово-ризобияльного симбиоза, обусловленного структурой ЭПС [Kawaharada et al., 2017]. Было высказано предположение, что количество ЭПС, вырабатываемых ризобиями, связано с оптимизацией взаимодействия микросимбионта с макросимбионтом [Jones, 2012]. Таким образом, ЭПС это один из ключевых факторов для достижения успешного взаимодействия между симбиотическими партнерами.

Целью данной работы было изучение влияния сверхэкспрессии гена *rosR*, участвующего у ризобий в регуляции синтеза ЭПС, на эффективность колонизации бактериями корней растений рапса. Для этого ген *rosR* был амплифицирован и клонирован в вектор для трансформации бактерий pJB658 под управлением индуцибельного промотора P_m. Полученной векторной конструкцией были трансформированы ростостимулирующие штаммы *R. leguminosarum* ГЛЗ, *R. leguminosarum* VSy12. В дальнейшем контрольными и трансформированными штаммами были инокулированы растения рапса сорта Ратник. Было показано, что трансформация не оказывает существенного влияния на прорастание семян и рост корней растений – разница с дикими типами штаммов не имела достоверных различий. Анализ уровня колонизации корней после 7 сут. совместного культивирования показал незначительное увеличение «заякорившихся» на корнях бактерий в случае трансформированных штаммов по сравнению с контрольными штаммами. При этом через 3–4 сут. микроскопирование выявило образование на корнях растений бактериальных агрегаций и микроколоний преимущественно для трансформированных штаммов. Также было показано, что штамм VSy12 образует биопленки преимущественно на поверхности корней растений, в отличие от ГЛЗ, сродство которого выше к корневым волоскам. Эксперимент по обработке протеазами выявил повышение устойчивости клеточных агрегаций в случае трансформированных штаммов по сравнению с контрольными штаммами в среднем на 30 %. Не было выявлено существенных различий в устойчивости к антибиотикам биопленок, образованных контрольными и трансформированными штаммами на корнях растений.

Ранее было показано что трансформация штаммов *R. leguminosarum* генами *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок как на инертных поверхностях, так и на корнях таких растений как клевер луговой и томат. Более того, было обнаружено, что повышенная экспрессия *rosR* может защитить эти

бактерии от протеаз, детергентов и способствовать выживанию ризобий при низком содержании питательных веществ в окружающей среде [Вершинина и др., 2021]. Вследствие этого, использование генов, участвующих в образовании ЭПС ризобиями, в качестве трансгенов имеет перспективы не только для создания эффективных биодобровений для бобовых растений, но и для конструирования ассоциативных взаимодействий ризобий с небобовыми растениями, которые могут найти применение в сельском хозяйстве и биоремедиации.

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» Института биохимии и генетики УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4).

Литература

Вершинина З. Р., Чубукова О. В., Никоноров Ю. М., Хакимова Л. Р., Лавина А. М., Каримова Л. Р., Баймиев Ан. Х., Баймиев Ал. Х. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* // Микробиология. 2021. Т. 90, № 2. С. 191–203.

Bogino P., Oliva M., Sorroche F., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // International journal of molecular sciences. 2013. Vol. 14, № 8. P. 15838–15859.

Jones K. M. Increased production of the exopolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago truncatula* // Journal of bacteriology. 2012. Vol. 194. P. 4322–4331.

Kawaharada Y., Nielsen M. W., Kelly S., James E. K., Andersen K. R., Rasmussen S. R., Stougaard J. Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia // Nature communications. 2017. Vol. 8. P. 14534.

Kelly S. J., Muszyński A., Kawaharada Y., Hubber A. M., Sullivan J. T., Sandal N., Ronson C. W. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis // Molecular plant-microbe interactions. 2013. Vol. 26, № 3. P. 319–329.

Marczak M., Mazur A., Król J. E., Gruszecki W. I., Skorupska A. Lipoprotein PssN of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: subcellular localization and possible involvement in exopolysaccharide export // Journal of bacteriology. 2006. Vol. 188, № 19. P. 6943–6952.

СТРАТЕГИИ ВЫЖИВАНИЯ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ С РАЗНЫМ АКТИВНЫМ КОМПОНЕНТОМ У КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Н. М. Воропаева¹, К. О. Ситникова¹, М. В. Сухорева²,
Е. С. Сухарева², Н. Л. Белькова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

²Областное государственное автономное учреждение здравоохранения «Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница», г. Иркутск, e-mail: imdkb@imdkb.ru

Введение. Создание микроорганизмами пленок на любых поверхностях является большой проблемой в медицинской практике и в различных областях человеческой жизнедеятельности. Установлено, что в 80 % случаев инфекционные заболевания у людей проходят в форме биопленочной инфекции [Алешукина и др., 2020]. Несмотря на то что изучением характеристик штаммов, циркулирующих во внутрибольничной среде, активно занимаются во всем мире, в том числе и в Российской Федерации, работ по оценке способности этих микроорганизмов образовывать биопленки явно недостаточно. Между тем данная характеристика имеет особое значение, так как в составе биопленок микробные клетки выживают при стандартной обработке дезинфектантами, что способствует их сохранению во внутрибольничной среде [Савилов и др., 2020].

Цель исследования – моделирование процессов образования биопленок штаммами *Klebsiella pneumoniae*, а также их ингибирование и деструкцию под воздействием дезинфицирующих средств с разным активным компонентом.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 штаммов *K. pneumoniae*, полученные из двух многопрофильных детских стационаров городского (Ивано-Матренинская детская больница, ИМБ) – 10 штаммов, и регионального уровня (Иркутская областная детская клиническая больница, ИОДКБ) – 10 штаммов. Все штаммы обладали множественной антибактериальной резистентностью. Идентификацию выделенных культур осуществляли бактериологическим методом с учетом морфологических, культуральных, тинкториальных и биохимических свойств. Также идентификация была подтверждена MALDI-TOF прямого белкового профилирования непорообразующих микроорганизмов. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе UltraflExtreme (Bruker Daltonics, Германия).

Для моделирования процессов ингибирования и деструкции были использованы следующие дезинфицирующие средства (ДС) с разными активными компонентами: «Биодез Экстра ДВУ» ООО «Биодез», содержащий в своем составе четвертично-аммонийные соединения (ЧАС), кислородосодержащий Секусепт Актив ЗАО «Эколаб» и хлорсодержащий Деохлор ООО «Део». Согласно инструкции производителя концентрации ДС для дезинфекции и стерилизации инструментов медицинского назначения при бактериальных, вирусных инфекциях и кандидозе рекомендуются для Биодез 0,1, 1 и 3 %, для Секусепт Актив – 0,5, 1,5 и 3 %, для Деохлор – 0,1, 0,2 и 1 %.

Подготовка штаммов к исследованию, моделирование процессов биопленкообразования, ингибирования и деструкции проводили согласно ранее разработанным методикам [Немченко и др., 2020; Григорова и др., 2021].

Результаты и обсуждения. Согласно полученным результатам все штаммы обладали значительной скоростью роста. Оптическая плотность (ОП) бактериальных суспензий за 24 ч увеличилась более чем в два раза. Все штаммы, полученные из ИМБ, обладали низкой способностью к биопленкообразованию и коэффициент биопленкообразования (КБП) варьировал от 0,6 до 1,3. Девять из десяти штаммов, полученных из ИОДКБ, так же были отнесены к слабообразующим БП с коэффициентами КБП от 0,79 до 1,76, и только один штамм продемонстрировал умеренную способность к формированию БП (КБП 2,18).

В исследовании влияния ДС на рост планктонных клеток среди штаммов, полученных из ИМБ, в большинстве случаев наблюдали слабый и значительный рост клеток после воздействия практически всех концентраций ДС. Отсутствие прироста ОП планктонных клеток было зафиксировано только при максимальных концентрациях для Секусепт Актив и Деохлор у одного штамма в каждом случае и у двух штаммов, при минимальной концентрации Биодез.

Сходный результат наблюдали для штаммов *K. pneumoniae*, полученных из ИОДКБ. В этом случае, значительный рост наблюдали после воздействия ДС Биодез во всех концентрациях (от 5 до 9 штаммов), Секусепт Актив – во всех концентрациях у 10 штаммов и Деохлор – от 7 до 9 штаммов были устойчивы к воздействию всех трех концентраций ДС.

При моделировании процессов ингибирования образования БП наиболее эффективным оказался Деохлор. Данное ДС способно ингибировать формирование БП штаммов *K. pneumoniae* из ИМБ в кон-

центрации 0,1 и 0,2 % у трех штаммов в каждом случае, и 4 и 3 штаммов из ИОДКБ соответственно. При деструкции зрелых БП данное ДС оказалось менее эффективно и оказывало слабое влияние только в концентрации 1% у 4 штаммов из ИОДКБ. Биодез не оказывал ингибирующего влияния на формирование БП и не разрушал сформированные БП штаммов, полученных из ИМБ, тогда как на штаммы из ИОДКБ в концентрации 0,1 и 1 % на 4 и 2 штамма оказывал слабое ингибирующее воздействие на формирование БП соответственно. На процессы деструкции зрелых БП Биодез воздействовал только у 2 штаммов в концентрации 0,1 % и в концентрации 1 и 3,0 % – у 1 штамма каждый. Секусепт Актив проявил слабое воздействие на процессы ингибирования формирования БП в обоих стационарах. Среди штаммов из ИМБ, только 1, 2 и 3 штамма (при концентрации 0,5, 1,5 и 3 % соответственно) подвергались слабому воздействию ДС на процесс ингибирования формирования БП, среди штаммов из ИОДКБ – 1 и 4 штамма (при концентрации 1,5 и 3 % соответственно). На процессы деструкции зрелых БП Секусепт Актив влияния не оказывал.

Таким образом, все три ДС проявили слабое влияние на процессы ингибирования формирования БП и деструкции зрелых БП. Вероятно, это связано с низким КБП данных штаммов.

Литература

Алешукина А. В., Голошва Е. В., Твердохлебова Т. И. Исследование влияния дезинфицирующих средств на биопленкообразующие неферментирующие бактерии // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2020. № 1. С. 89–94. <https://doi.org/10.18522/1026-2237-2020-1-89-94>

Григорова Е. В., Немченко У. М., Воропаева Н. М., Белькова Н. Л., Носкова О. А., Савилов Е. Д. Биопленкообразование под воздействием дезинфицирующих средств с разным активным компонентом у *Pseudomonas aeruginosa* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 171, № 6. С. 733–73. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-6-733-738>

Немченко У. М., Кунгурцева Е. А., Григорова Е. В., Белькова Н. Л., Маркова Ю. А., Носкова О. А., Чемезова Н. Н., Савилов Е. Д. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. № 65 (10). С. 652–658. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658>

Савилов Е. Д., Маркова Ю. А., Немченко У. М., Носкова О. А., Чемезова Н. Н., Кунгурцева Е. А., Духанина А. В. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара // Тихоокеанский медицинский журнал. 2020. №1. С. 32–35. <https://doi.org/10.34215/1609-1175-2020-1-32-35>

ВНУТИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ СРЕДИ ДИКИХ ШТАММОВ *RHIZOBIUM RADIOBACTER* И *RHIZOBIUM RHIZOGENES* ПО ПРИЗНАКУ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ

Л. А. Максимова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: VendyS@yandex.ru

Биопленкообразование микроорганизмов – сложный, генетически детерминированный признак [Rather, 2021]. Гетерогенность популяции по различным признакам обеспечивает ее устойчивость при изменении условий окружающей среды. Было предположено наличие гетерогенности по признаку биопленкообразования среди диких штаммов *Rhizobium radiobacter* и *Rhizobium rhizogenes*. Известно, что процесс биопленкообразования у ряда видов микроорганизмов зависит от особенностей питательной среды. Было изучено биопленкообразование диких штаммов *Rhizobium radiobacter* и *Rhizobium rhizogenes* на средах с высоким содержанием органических веществ (YPD Sigma) и низким (E8, 5 % глюкоза).

Были использованы 6 штаммов *Rh. radiobacter* (8628, C58M, A4, TiC58, B₀542, B₆S₃) и 5 штаммов *Rh. rhizogenes* (1000, 15834, 8196, RiC58, RiC58C1) из коллекции микроорганизмов ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН. Матричные суспензии микроорганизмов выращивались в течение суток, в колбах при покачивании, в темноте при 25 °С на питательной среде YPD или E8.

Матричную суспензию разводили фосфатным буфером до 0,3–0,4 оптической плотности ($\lambda = 595$ нм), раскапывали по 10 мкл в 96-луночные планшеты, добавляли по 170 мкл соответствующей среды YPD или E8, и инкубировали при 38 °С. Оптическую плотность бактериальной суспензии в лунках измеряли на планшетном фотометре iMark™ Microplate Reader (BioRad, США), при $\lambda = 595$ нм. Для определения уровня биопленкообразования, сорбировавшиеся в лунках 96-луночного планшета бактериальные клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Через 45 мин инкубации краситель сливали и в лунки планшета вносили 96 % этанол. Интенсивность окраски кристаллического фиолетового в этаноле определяли при $\lambda = 490$ нм. Прирост клеточной суспензии выражался как разность значений оптической плотности суспензии в первый и третий день эксперимента. Степень биопленкообразования измеряли на 3-и сут. – и выражали как оптическую плотность при окрашивании кристаллическим фиолетовым.

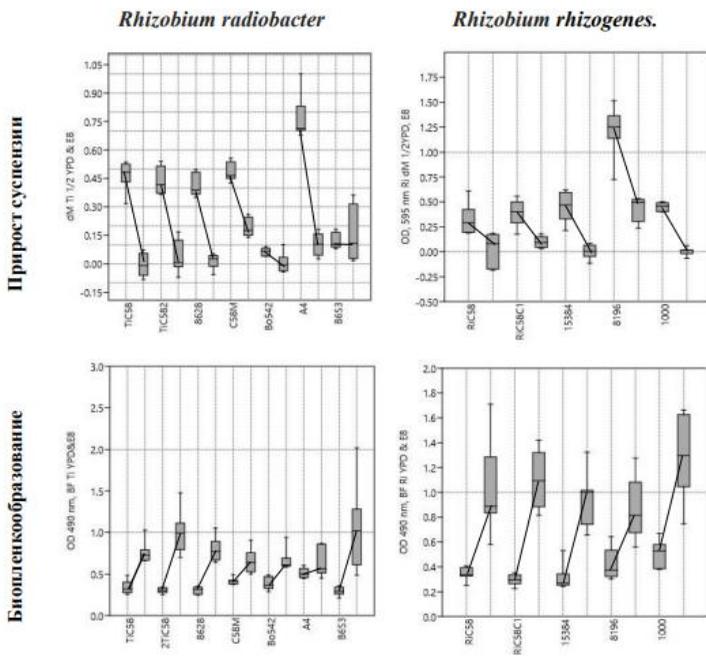


Рис. Влияние состава среды на рост суспензии и биоупленкообразование штаммов *Rhizobium radiobacter* и *Rhizobium rhizogenes*. Линиями соединены значения оптической плотности, полученные при росте одного штамма на среде YPD (первый бокс) и E8 (второй бокс)

Результаты. На среде с высоким содержанием органических соединений ожидаемо увеличивается количество планктонных бактериальных клеток *Rh. radiobacter* и *Rh. rhizogenes* и снижается степень биоупленкообразования. На среде с низким содержанием органических соединений снижается количество планктонных бактериальных клеток и увеличивается степень биоупленкообразования (рис.). Выявлена гетерогенность в изменение роста и биоупленкообразования среди разных штаммов. Так, например, штамм А4 *Rh. radiobacter* демонстрирует активный рост суспензии на богатой органикой среде YPD, но незначительный рост биоупленок на минеральной среде E8 (рис.). Штамм В₆С₃, напротив, показывает умеренный рост суспензии на среде YPD, но существенное увеличение количества биоупленок на среде E8. Прослеживается четкая тенденция у диких штаммов видов *Rhizobium radiobacter* и *Rhizobium rhizogenes* к изменению

роста и биопленкообразования бактериальной популяции на разных средах, что подтверждает аналогичные сведения о других видах микроорганизмов, известные из литературных источников. На среде с большим количеством доступной органики YPD, что очевидно расценивается микроорганизмами как благоприятные условия, изучаемые штаммы демонстрируют интенсивный рост и слабое биопленкообразование. Вполне ожидаемо, что среда с малым количеством доступной органики, которое быстро заканчивается, расценивается микроорганизмами как неблагоприятная, и они переходят в сберегающую форму существования – биопленки. Штаммы с высокой скоростью роста, по всей вероятности, имеют преимущество как «авангард» при пространственной экспансии вида. Однако есть штаммы, которые демонстрируют весьма умеренный рост на богатой питательной среде. Предположительно, эти штаммы обладают способностью намного быстрее переходить из планктонной фазы в защитную sessильную. Подобная стратегия штаммов-«карьергардов» очевидно позволяет сохранить присутствие вида микроорганизма в освоенной экологической нише при изменении условий среды.

Работа выполнялась в рамках проекта № 0277-2021-0004 «Изучение молекулярных механизмов физиологических процессов и аллелопатии в растительно-микробных взаимоотношениях».

Литература

Rather M. A., Gupta K., Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies // Brazilian Journal of Microbiology. 2021. Vol. 52. P. 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА С БИОПЛЕНКАМИ, ОБРАЗОВАННЫМИ УРОПАТОГЕННЫМИ ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* С РАЗНЫМ ПАТОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

И. Л. Масленникова¹, И. В. Некрасова¹, М. Starcic Erjavec²,
М. В. Кузнецова¹

¹«ИЭГМ УрО РАН», Пермь, e-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

²Люблянский университет, Словения, e-mail: marjanca.starcic.erjavec@bf.uni-lj.si

Уропатогенная *Escherichia coli* (UPEC) является возбудителем 70–95 % внебольничных и более 50 % внутрибольничных инфекций мочевыводящих путей (ИМП) [Grabe et al, 2015]. В патогенез ИМП вносят вклад различные факторы вирулентности UPEC, такие как адгезины (пили I типа, *fimH*; S-пили, *sfaDE*; P-фимбрии, *papC*; афимбриальный адгезин Afa, *afa/draBC*), инвазины (*ibeA*), токсины (гемолизин α , *hlyA*; цитотоксический некротизирующий фактор 1, *cnf1*), системы захвата железа (*iroN*). Формирование биопленок UPEC на биотических (слизистые оболочки) и абиотических поверхностях (катетеры) также является причиной персистирующих и тяжелых деструктивных процессов при ИМП [Naziri et al., 2021]. Не исключено, что вирулентный потенциал UPEC и исход инфекции может определяться разными факторами: условиями биотопа при дисфункциях мочевыводящих путей; возможностью горизонтального переноса факторов патогенности в биопленках; влиянием нейтрофилов – клеток врожденной иммунной системы, играющих важную роль в противомикробной защите.

Цель данной работы: оценить взаимное влияние нейтрофилов и биопленок, образованных UPEC с разным патогенным потенциалом.

В работе использовали уропатогенные штаммы *E. coli* R11, *E. coli* R32, *E. coli* R33, *E. coli* R36, *E. coli* R44, *E. coli* R45 (L-5902, L-5807, L-5808, L-5811, L-5819 и L-5820, соответственно, номера в коллекции MYCOSMO EX, Словения). Факторы вирулентности (*papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *cnf1*, *hlyA*, *iroN*, *ibeN*), филогруппу и коровый профиль штаммов определяли с использованием набора праймеров согласно [Kuznetsova et al, 2021]. Штаммы *E. coli* N4i pOX38:Сm и уропатогенный *E. coli* DL82, любезно предоставленные профессором М. Starcic Erjavec (Словения), использовались в качестве донора и реципиента, соответственно, при оценке конъюгации.

Биопленки UPEC выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах в течение 24 ч на среде LB (Luria-Bertani) (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С статически, супернатант отбирали и стерилизовали

фильтрацией, затем биопленки 3-кратно отмывали физиологическим раствором. Нейтрофилы периферической крови здоровых мужчин ($n = 3-4$) выделяли на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 г/мл и 1,112 г/мл), затем 100 мкл клеток (10^5 кл/мл в RPMI) наслаивали на 24 ч биопленки UPEC. В контроль добавляли RPMI. При конъюгации к биопленке *E. coli* DL82 добавляли суспензию (100 мкл) донорного штамма, активированного 2 ч на RPMI среде, и нейтрофилы. После 4 ч культивирования с бактериальными биопленками межклеточный комплекс отмывали, делали высевы из биопленок UPEC или определяли их биомассу согласно [O'Toole et al., 2000].

Клетки бактерий освобождали из биопленок ультразвуком (Elma Ultrasonic 30S, Германия) 5 раз по 1 мин и ресуспендировали в среде RPMI 1640. Нейтрофилы (250 мкл; 10^5 кл/мл) культивировали с клетками биопленок UPEC (100 мкл суспензии) или их супернатантами (250 мкл) в течение 1 ч в RPMI среде. Жизнеспособность нейтрофилов оценивали с помощью DiOC6(3)/PI красителей на проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, США).

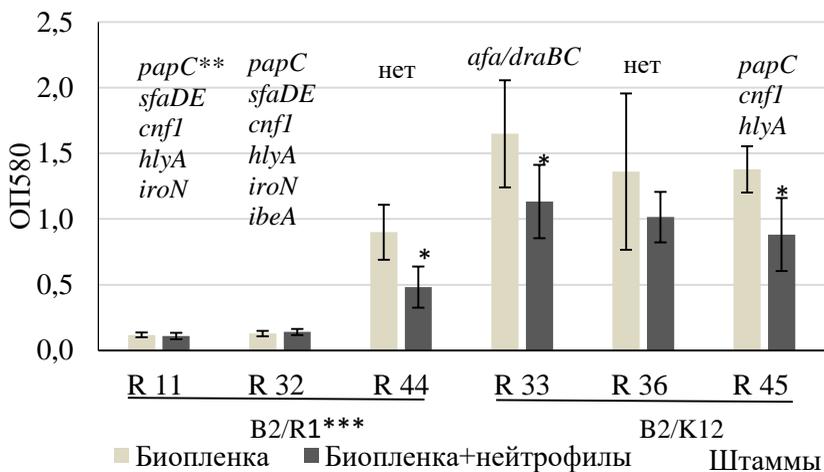


Рис. Биомасса биопленки штаммов UPEC после 4 ч взаимодействия с нейтрофилами человека. * – достоверные отличия между вариантами при $p < 0,05$; ** – перечень генов, присутствующих в штамме; *** – филогруппа/коровый профиль

Штаммы UPEC, принадлежавшие к филогруппе B2, имели разные коровые профили – R1 (R11, R32, R44) и K12 (R33, R36, R45), что влияло на уровень биопленкообразования (рис.). *E. coli* R11 и R32 с

большим набором вирулентных факторов характеризовались низкой биомассой биопленки, которая не изменялась после взаимодействия с нейтрофилами. Напротив, штаммы с меньшим набором факторов патогенности (R33, R45, R44) характеризовались более массивной биопленкой, биомасса которой снижалась после взаимодействия с нейтрофилами.

Анализ жизнеспособности нейтрофилов позволил выявить, что клетки и супернатанты биопленок всех штаммов UPEC снижали жизнеспособность (DiOC6(3)⁺/PI) и стимулировали ранний апоптоз (DiOC6(3)⁻/PI) нейтрофилов, однако достоверной разницы в действии супернатантов и клеток R11 и R32 на нейтрофилы не выявлено, в отличие от штаммов R44, R33, R36, R45, где супернатанты оказывали меньшее воздействие на жизнеспособность и апоптоз нейтрофилов.

Влияние нейтрофилов (10^5 – 10^6 кл/мл) на конъюгативный перенос в клетки *E. coli* DL82, обладающего массивной биопленкой, не выявлено.

Данные о взаимном влиянии эффекторов иммунитета и бактериальных биопленок способствуют более глубокому пониманию механизмов внутривидового взаимодействия *E. coli* в биопленках, что позволит выявить особенности и закономерности персистенции UPEC при инфекциях мочевыводящих путей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта №19-44-590014 p_a.

Литература

Grabe M., Bjerklund-Johansen T. E., Botto H., Çek M., Naber K. G., Tenke P., Wagenlehner F. Guidelines on urological infections // European association of urology. 2015. Vol. 182. P. 237–257.

Kuznetsova M. V., Maslennikova I. L., Pospelova J. S., Žgur Bertok D., Starčić Erjavec M. Differences in recipient ability of uropathogenic *Escherichia coli* strains in relation with their pathogenic potential // Infect Genet EVol. 2021. Vol. 97:105160.

Naziri Z., Kilegolan J. A., Moezzi M. S., Derakhshandeh A. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*: a complicating factor for treatment and recurrence of urinary tract infections // J. Hosp Infect. 2021. Vol. 117. P. 9–16.

O'Toole G. F., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // Ann. Rev. Microbiol. 2000. Vol. 54. P. 49–79.

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* С ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ *IN VITRO*

Е. В. Матосова

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора
Владивосток, e-mail: e_matosova@mail.ru

Salmonella enterica в современный период является одним из наиболее значимых кишечных бактериальных патогенов. Для эффективного распространения в организме животных и человека бактериям необходимо адаптироваться к неблагоприятным для них условиям, взаимодействуя с бактериальными сообществами, сформированными в кишечнике хозяина. Бактерии нормальной кишечной микробиоты выстилают слизистые кишечника в виде биопленок, образуя защитный барьер, препятствующий контаминации организма постоянной микрофлорой. В статье представлены результаты исследования, показывающие способность *Salmonella enterica* Typhimurium к биопленкообразованию, в том числе в условиях межвидового взаимодействия в поликультуральной биопленке с представителями кишечной микробиоты в эксперименте *in vitro*.

В работе использовали бактерии *Salmonella enterica* серовар Typhimurium ATCC 13311, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 и *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Remel Europe Ltd, UK), *Escherichia coli* СЕСТ M17 (Microgen, РФ) в лог-фазе (24 ч инкубации). Биопленки формировали в смеси LB-бульона с 0,85 % раствором NaCl в соотношении 1:3 в начальной концентрации бактерий 10^3 КОЕ/мл (по стандарту мутности ГИСК имени Л. А. Тарасевича) в полистироловых чашках Петри диаметром 65 мм при температуре +37°C. Динамику образования биопленок оценивали в течение 12 сут. методом спектрофотометрии (длина волны 595 нм), визуализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для учета количества жизнеспособных клеток в биопленках использовали чашечный метод. После завершения инкубации биопленки 3-кратно отмывали 0,85 % раствором NaCl от планктонных форм, отделяли от дна чашки в пробирки, центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Для посева на селективных средах (Вильсона-Блэйра – висмут-сульфит агар, агар Плоскирева, Эндо агар, лактобакагар) методом кратных разведений использовали осадок. Для измерения оптической плотности матрикс биопленки окрашивали генциановым фиолетовым [Плакунов, 2016]. После 3-кратной обработки 0,85 % раствором NaCl образцы для исследования с помощью СЭМ фиксировали комплексным раствором,

предложенным Ито с соавторами [Уикли, 1975] с постфиксацией 1 % раствором OsO₄ (Serva). Дегидратацию проводили в ацетоне с возрастающей концентрацией (10–100 %). Поверхность образцов напыляли платиной и исследовали в сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss Ultra 55 (Германия). Для оценки тинкториальных свойств образцы бактерий окрашивали по Граму. Ферментативные свойства оценивали с использованием сред Гисса и дифференциально-диагностических сред. При статистической обработке данных использовали программу MS Excel 2010. Статистическая обработка результатов включала расчет средних значений величин (\bar{x}) и среднеквадратического отклонения (σ). О достоверности различий между выборками судили по величине t -критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически значимыми считали показатели, соответствующие оценке вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты. Все исследуемые штаммы бактерий проявляли высокую способность к образованию биопленок в монокультуре. Максимальные значения ($p < 0,05$) величины оптической плотности биопленки *Salmonella enterica* Typhimurium наблюдались в первые сутки эксперимента. Значения оптической плотности матрикса представителей кишечной микробиоты были ниже, чем у сальмонелл и достигли максимума к 3 суткам. При этом количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) во всех монокультуральных биопленках увеличивалось неравномерно. У *S. enterica* Typhimurium увеличилось на 4 lg к третьим суткам ($6,88 \pm 0,41 \times 10^7$ КОЕ/мл), достигнув максимального значения на 5 сутки ($5,28 \pm 0,45 \times 10^8$, $p < 0,05$), и в последующие сутки оставалось на достигнутых уровнях. У *E. coli* максимальные значения КОЕ/мл были обнаружены на 3 сутки ($1,67 \pm 0,13 \times 10^9$, $p < 0,05$), в последующем наблюдалось постепенное снижение показателей. Бактерии рода *Lactobacillus* также достигли максимального количества к третьим суткам ($2,95 \pm 0,39 \times 10^6$, $3,44 \pm 0,35 \times 10^5$, $p < 0,05$).

В поликультуральных биопленках наибольшие значения оптической плотности были зарегистрированы в первые сутки при совместном культивировании *Salmonella enterica* Typhimurium с *Escherichia coli* и *Lactobacillus casei*, в отличие от результатов с *Lactobacillus acidophilus*, которые были сходны с показателями монокультуры *Salmonella enterica*. В следующие дни эксперимента плотность матрикса при совместном биопленкообразовании уменьшалась. Сравнение показателей КОЕ/мл *Salmonella* Typhimurium в поликультуральных и монокультуральной биопленках показало следующие результаты. В 1 сутки наблюдения количество жизнеспособных клеток *E. coli* зна-

чительно превышало данные показатели у *Salmonella*, что может свидетельствовать о подавлении роста патогена представителями кишечной микробиоты за счет конкурентного взаимодействия. При этом показатель КОЕ/мл у сальмонелл в поликультуральных биопленках был соотносим с численностью в монокультуре. На 3 сутки количество жизнеспособных клеток как *S. enterica*, так и *E. coli* в биопленках существенно возросло (до $8 \lg$), превышая значения сальмонелл в монокультуре ($p > 0,05$), и не различалось между представителями семейства, что может быть связано с недостаточностью антагонистических действий *E. coli*. Было отмечено значительное подавление *Lactobacillus* spp. относительно показателей монокультур. К окончанию эксперимента было отмечено доминирование сальмонелл над *E. coli* и *Lactobacillus* spp. ($p > 0,05$).

СЭМ использовалась для изучения сложности и структурной неоднородности биопленок. На изображениях монокультуральных биопленок *Salmonella* Typhimurium видно, что бактерии в первые сутки образовали плотный матрикс с немногочисленными делящимися клетками бактерий, закрепленными на поверхности или частично погруженными в монослой биопленки. На поверхности клеток заметен аморфный матрикс. Бактерии связаны между собой фибрилоподобными мостиками межклеточной слизи. В последующие периоды наблюдения бактериальные клетки патогена на изображениях погружены в слой матрикса, количество бактерий многократно увеличилось. В биопленках видны поры, в которых расположены крупные скопления бактериальных клеток, связанных между собой многочисленными фибрилоподобными соединениями. С развитием эксперимента на поверхности биопленки появляются поврежденные клетки, которые имеют шероховатый и сморщенный вид, очевидна деформация.

На изображениях биопленок, образованных *Salmonella* Typhimurium совместно с *E. coli* в первые сутки эксперимента определяется большое количество бактериальных клеток, погруженных в матрикс, сходно с результатами СЭМ монокультуры *E. coli*. Через 72 ч появляются участки «вплавления» бактериальных клеток в слой биопленки. Заметно распределение групп клеток в виде островков на поверхности и отдельных участков в матриксе, расположенных на значительном расстоянии друг от друга. Заметны мелкие плотные структуры, предположительно белковой природы, возможно бактериоцины.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности бактерий *Salmonella enterica* Typhimurium к биопленкообразованию, в том числе в сложных для них условиях взаимодействия с представителями кишечной микробиоты.

Литература

Плаунов В. К., Мартянов С. В., Тетенева Н. А., Журина М. В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. № 85(4). С. 484–489.

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М. : Мир, 1975. 320 с.

ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

А. В. Миронова, М. С. Федорова

Е. Ю. Тризна, А. Р. Каюмов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
e-mail: amironova2019@mail.ru

Устойчивость бактерий к антимикробным препаратам в полимикробных сообществах может быть в разы выше по сравнению с мономикробными биопленками бактерий того же вида, а отсутствие эффективных методов лечения полимикробных инфекций вызывает необходимость разработки новых альтернативных методов борьбы с биопленками. Такой альтернативой может стать использование антагонизма бактерий.

Целью работы было установить антимикробную активность внеклеточных метаболитов золотистого стафилококка против биопленок *P. aeruginosa* и *K. pneumonia*.

На первом этапе проведена оценка влияния культуральной жидкости *S. aureus* на жизнеспособность *P. aeruginosa* и *K. pneumonia* путем подсчета КОЕ. При добавлении аминогликозидов и ципрофлоксацина с культуральной жидкостью *S. aureus* наблюдалась гибель открепившихся клеток и клеток в биопленке *P. aeruginosa* при концентрации антибиотиков 2 мкг/мл (0,03×МБК антибиотиков), тогда как внесение антибиотиков в питательную среду не влияло на жизнеспособность *P. aeruginosa*.

Подобный эффект был менее выражен в отношении открепившихся клеток и погруженных в биопленку *K. pneumonia*. Однако, как и в случае с *P. Aeruginosa*, эффективность всех антибиотиков была выше при добавлении культуральной жидкости золотистого стафилококка, чем в питательной среде и в культуральной жидкости смешанного сообщества. Чувствительность открепившихся клеток *K. pneumonia* к гентамицину и ципрофлоксацину в присутствии куль-

туральной жидкости *S. aureus* была выше, чем у клеток в составе биопленок и полная гибель бактерий наблюдалась при концентрации антибиотиков 256 мкг/мл и 512 мкг/мл соответственно.

Чтобы выявить продукцию наибольшего числа внеклеточных метаболитов *S. aureus* проводили подбор условий культивирования. Культуральную жидкость, полученную после культивирования *S. aureus* в различных условиях, вносили в планшеты со зрелой биопленкой *P. aeruginosa* и инкубировали 24 ч при 37 °С без качания, затем проводили оценку жизнеспособности клеток *P. aeruginosa* с помощью резазуринового теста. Внесение культуральной жидкости *S. aureus*, полученной в результате аэрируемого роста приводило к гибели открепившихся клеток *P. aeruginosa* при концентрации жидкости 50 %, а клеток в биопленке при концентрации 25 %. Культуральная жидкость *S. aureus*, полученная при формировании биопленок была менее эффективна

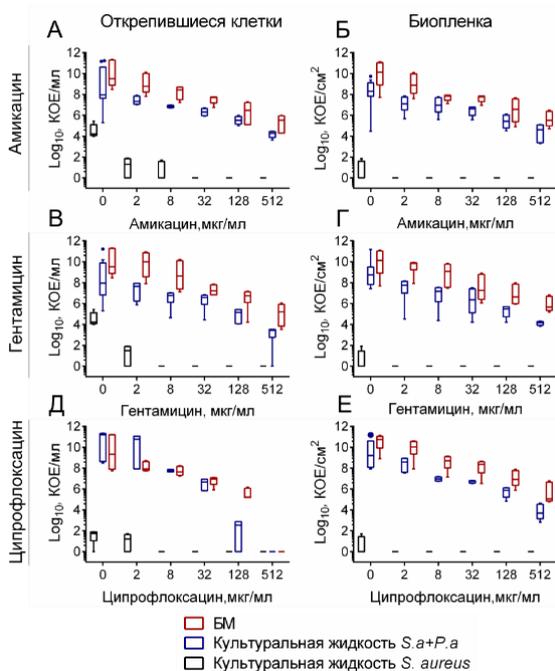


Рис. 1. Количество жизнеспособных открепившихся клеток и клеток в составе биопленки *P. aeruginosa* в присутствии культуральной жидкости *S. aureus* и антибиотиков. Жизнеспособность оценивали путем подсчета КОЕ после серии десятикратных разведений

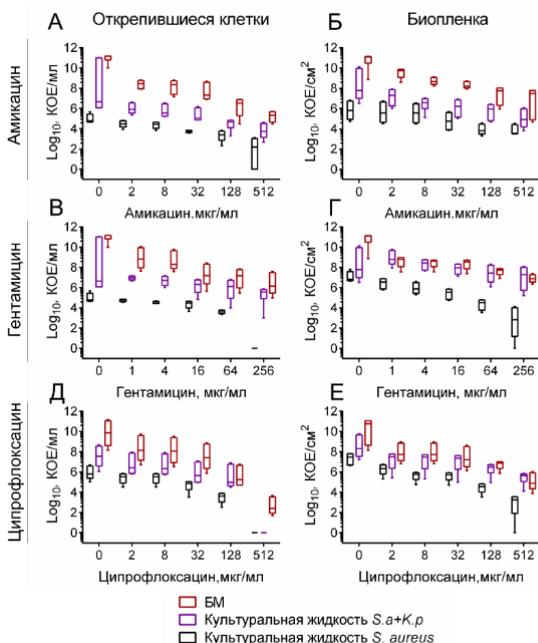


Рис. 2. Количество жизнеспособных открепившихся клеток и клеток в составе биопленки *K. pneumoniae* в присутствии культуральной жидкости *S. aureus* и антибиотиков. Жизнеспособность оценивали путем подсчета КОЕ после серии десятикратных разведений

Проведена сравнительная оценка антимикробной активности метаболитов 4 клинических штаммов *S. aureus* и штамма ATCC 29213. Внесение культуральной жидкости всех исследуемых штаммов приводила к гибели клеток *P. aeruginosa*. Метаболиты *S. aureus* способны оказывать бактерицидное действие в отношении *P. aeruginosa*. Все исследуемые в работе штаммы *S. aureus* способны продуцировать внеклеточные метаболиты, которые приводят к гибели клеток *P. aeruginosa*.

Также была проведена оценка эффективности метаболитов *S. aureus* в отношении различных клинических штаммов *P. aeruginosa*. Внесение культуральной жидкости *S. aureus*, выращенного в аэрируемых условиях приводило к гибели открепившихся клеток и клеток в составе биопленки *P. aeruginosa*. При концентрации метаболитов 100 %, все клетки были нежизнеспособными. Для штамма *P. aeruginosa* ATCC 2785 и клинических штаммов *P. aeruginosa* 5 и 260 наблюдалась гибель клеток при концентрации метаболитов *S. aureus* 50 %. Исходя из

полученных результатов можно сделать вывод, что внеклеточные метаболиты *S. aureus* обладают бактерицидной активностью против клинических изолятов *P. aeruginosa*, однако их эффективность является штаммоспецифичной.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №20-64-47014).

ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

У. М. Немченко¹, К. О. Ситникова¹, Н. Л. Белькова¹,
Е. В. Григорова¹, Н. М. Воропаева¹, М. В. Сухорева²
Е. С. Сухарева², Е. Д. Савилов¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
Иркутск, e-mail: umnemch@mail.ru

²Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница, Иркутск

Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* стабильно занимает лидирующие позиции среди возбудителей нозокомиальных инфекций в РФ и входит в группу бактерий-оппортунистов, объединенных термином ESKAPE [Склеенова и др., 2018]. Наличие широкого спектра патогенетических факторов, генетическая пластичность, способность быстро приобретать резистентность к разным группам антибиотиков делает *P. aeruginosa* одним из самых проблемных патогенов в лечебных учреждениях [Шек и др., 2019]. Лечение инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, осложняется способностью этих бактерий существовать в биопленке, что повышает их устойчивость к антибиотикам, распространенность и выживаемость [Olivares et al., 2020].

Цель исследования – оценка чувствительности штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в планктонной форме и в форме биопленки, к воздействию антимикробных препаратов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись 10 штаммов *P. aeruginosa* с подтвержденной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам (АМП) и типовой штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, собранной в течение 2018–2021 гг. Штаммы изолированы от пациентов из 2 лечебных учреждений г. Иркутска по принципу «один пациент – один изолят». Восемь культур было получено из ГБУЗ «Иркутская государственная

областная детская клиническая больница», две культуры из ОГАУЗ «Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница». Способность исследуемых культур к образованию биопленок (БП), расчет коэффициента биопленкообразования (КБП), ингибирование БП, разрушение сформированной БП под действием АМП проводили с помощью определения адгезии микроорганизмов с использованием 96-ти луночного стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета путем измерения оптической плотности (ОП) согласно разработанным ранее методикам [Немченко и др., 2020]. АМП (цефтазидим, имипенем, меропенем, цефепим, амикацин, ципрофлоксацин) вносили одновременно с суспензией клеток в мясо-пептонном бульоне (МПБ) для проверки эффективности воздействия на планктонные клетки и формирующиеся биопленки и через 24 ч. культивирования после удаления планктонных клеток для оценки способности разрушать АМП зрелые биопленки. В отдельном планшете проводили определение контрольных значений ОП БП, при этом клеточную суспензию не подвергали воздействию АМП. После 24 ч инкубирования БП окрашивали. Влияние различных АМП на процессы ингибирования и деструкции БП определяли, как отношение ОП биопленок, подвергшихся влиянию АМП, к ОП биопленок культур, не подвергавшимся влиянию АМП (БП_{инг}/БП_{без АМП} или БП_{дестр}/БП_{без АМП}). Для установления исходного уровня, превышение которого можно интерпретировать как способность АМП ингибировать образование или разрушать уже сформированную биопленку использовали следующие показатели: <0,9 АМП ингибирует или разрушает БП; от 0,9 до 1,0 – АМП слабо разрушает биопленку; от 1,0 и выше – АМП не ингибирует и не разрушает биопленку [Немченко и др., 2020].

Результаты исследования. Установлено, что планктонные клетки синегнойной палочки обладают значительной скоростью роста, увеличивая за 24 ч культивирования ОП более чем в десять раз по сравнению с начальной ($U_{эмп} = 0$, разница достоверна между ОП начальной и ОП через 24 ч, критерий Манна-Уитни). Большинство исследуемых штаммов, в том числе типовой АТСС 27853 относились к слабообразующим БП. Особняком выделялись два штамма (№ 7, № 8), выделенных от больных с муковисцидозом (МВ): они имели более выраженный КБП (в среднем КБП МВ *P. aeruginosa* $3,55 \pm 0,68$; других *P. aeruginosa* $1,61 \pm 0,34$). Под воздействием АМП культуры также продолжали расти, самыми не активными АМП были имипенем ($U_{эмп} = 0$) и меропенем ($U_{эмп} = 5$, нет разницы между ОП начальной и ОП через 24 ч, критерий Манна-Уитни). Наиболее эффективно

подавляли рост планктонных клеток цефепим, амикацин и цiproфлоксацин (в 54,5; 54,5 и 45,5 % случаев соответственно). Эксперимент показал, что не все АМП препятствовали образованию БП. Имипенем и меропенем не влияли на био пленкообразование в 36,4 и 27,3 % соответственно, цiproфлоксацин в 36,4 %, наиболее эффективно подавляли образование био пленок цефтазидим (100 %), цефепим (90,0 %) и амикацин (90,0 %). Самым активным АМП, подавляющим образование БП был цефтазидим (по сравнению с имипенемом, меропенемом и цiproфлоксацином ($p < 0,05$)). Чувствительность к воздействию АМП культур *P. aeruginosa*, находящихся в зрелой био пленке, была значимо ниже (по критерию Манна-Уитни, разница достоверна между ОП ингибирование и ОП деструкция БП, $p < 0,05$). В основном, все использованные АМП слабо или не воздействовали на БП *P. aeruginosa*, соотношение БП_{дестр}/БП_{без АМП} было от 0,9 в более 60 % случаев. Сравнение среднего значения КБП при ингибировании и деструкции био пленок показало, что в целом КБП культур *P. aeruginosa*, пребывающих в сформированной био пленке, был значимо выше, чем у культур, подвергшихся воздействию АМП до начала формирования био пленок ($U_{эмп} = 0$, $p < 0,01$).

Заключение. Таким образом, тестирование влияния АМП на БП *P. aeruginosa* показало, что препараты в основном, препятствовали образованию БП, но не разрушали уже сформированную БП. Выявленные значительные различия в действии испытанных АМП как на зрелую био пленку штаммов *P. aeruginosa*, так и на процесс ее формирования в определенной степени коррелируют с устойчивостью данного микроорганизма к целому ряду антибиотиков [Шек и др. 2019].

Литература

- Немченко У. М., Кунгурцева Е. А., Григорова Е. В., Белькова Н. Л., Маркова Ю. А., Носкова О. А. и др. Моделирование бактериальных био пленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65, № 10. С. 652–658. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658>
- Склеенова Е. Ю., Азизов И. С., Шек Е. А., Эйдельштейн М. В., Козлов Р. С., Дехнич А. В. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокоммиальных патогенов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. № 3. С. 164–171. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2018.3.164-171>
- Шек Е. А., Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н. В. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокоммиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019. Т. 21, № 2. С. 160–170. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2019.2.160-170>
- Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Bernardi T., Jehl F. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections // Frontiers in microbiology. 2020. № 10. P. 2894. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>

ВЛИЯНИЕ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛЮРОГЛЮЦИНОЛА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ *C. ALBICANS*

А. А. Степанов, А. С. Васильченко

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-Bio)
Тюменский государственный университет, Тюмень, e-mail: stepanov590@mail.ru

Актуальность. Микозы, вызываемые грибами рода *Candida*, являются одной из ключевых проблем здравоохранения [Сахарук, 2010]. В связи с высокой распространенностью кандидоза, а также возрастающей антимикотикорезистентностью у патогенных штаммов к конвенциональным антимикотикам, поиск новых соединений с антимикотическим действием является актуальной задачей [Gleeson, 2010].

Перспективными кандидатами на эту роль являются вторичные метаболиты почвенных микроорганизмов. Особый интерес представляют бактерии рода *Pseudomonas*, вторичные метаболиты которых обладают широким спектром действия, в том числе антимикотическим [Costa-de-Oliveira, 2020]. Однако особенности антимикотического действия, ровно как и механизмы резистентности к данным соединениям, в ряде случаев остаются малоизученными.

Цель – изучение влияния 2,4-диацетилфлюроглюцинола на биопленкообразование *C. albicans*.

Материалы и методы. В качестве продуцента 2,4-диацетилфлюроглюцинола использовали *Pseudomonas protegens* CV3. Для получения антимикробного соединения *P. protegens* CV3 культивировали в питательной среде LB, содержащей 1 % глюкозу, в течение суток при постоянной температуре (27 °C) и перемешивании (110 об/мин). Экстракцию антимикробного соединения из фильтрата культуральной жидкости *P. protegens* CV3 осуществляли методом твердофазной экстракции с использованием ацетонитрила в качестве растворителя. Фракционирование ацетонитрильного экстракта и получение 2,4-диацетилфлюроглюцинола (2,4-ДАФГ) производили методом ВЭЖХ.

В качестве тест-штамма использовали *Candida albicans* ATCC 10231. Оценено влияние 2,4-ДАФГ на биомассу и метаболическую активность биопленок *C. albicans* ATCC 10231. Морфология биопленок *C. albicans* ATCC 10231 подтверждена с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Проведен анализ двух неспецифических факторов биопленкообразования *C. albicans* ATCC 10231: гидрофобных свойств клеточной стенки, а также мицелиально-дрожжевого диморфизма.

Результаты. В результате работы выяснено, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 60 мкг/мл (0,5·МИК), 125 мкг/мл (1·МИК), 250 мкг/мл (2·МИК) и 500 мкг/мл (4·МИК) оказывает статистически значимое влияние на ингибирование биопленкообразования *C. albicans* АТСС 10231 в течение 48 ч с момента добавления соединения. Это отражается как в снижении общей биомассы биопленок, так и в уровне их метаболической активности

Кроме того, 2,4-ДАФГ способен оказывать влияние на зрелые, сформированные биопленки *C. albicans* АТСС 10231 в концентрациях 125 мкг/мл (1·МИК), 250 мкг/мл (2·МИК) и 500 мкг/мл (4·МИК). Однако статистически значимые отличия были замечены в метаболической активности биопленок, подверженных 2,4-ДАФГ, но не в показателях общей биомассы.

Обнаружено, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях 60 мкг/мл (0,5·МИК) и 30 мкг/мл (0,25·МИК) оказывает статистически значимое влияние как на гидрофобность клеточной стенки, так и на формирование ростовой трубки *C. albicans* АТСС 10231.

Выводы. Таким образом, 2,4-ДАФГ оказывает влияние на биопленкообразование, в том числе, в субингибиторных концентрациях. Кроме того, 2,4-ДАФГ способен воздействовать в субингибиторных концентрациях на неспецифические факторы биопленкообразования. Полученные результаты позволяют рассматривать 2,4-ДАФГ в качестве кандидата на роль нового антимикотика.

Литература

Сахарук Н. А., Козловская А. А. Кандидоз: этиология, клиника, диагностика, лечение. Витебск : ВГМУ, 2010. 192 с.

Gleeson O., O'Gara F., Morrissey J. P. The *Pseudomonas fluorescens* secondary metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae* // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. Vol. 97(3). P. 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9407-7>

Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A. G. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal // Microorganisms. 2020. Vol. 8. P. 154. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020154>

**ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА
МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

**ПОИСК НОВЫХ АГЕНТОВ
ДЛЯ СЕПТИРОВАНИЯ ДРЕВЕСИНЫ**

Л. А. Беловежец, К. У. Безаргикова, Т. В. Ганенко
Г. П. Александрова, Д. О. Самульцев

Иркутский институт химии СО РАН, Иркутск
e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Биоповреждения пищевых и промышленных материалов различными группами микроорганизмов наносят огромный экономический ущерб, который исчисляется десятками миллиардов рублей в год. Наиболее активные возбудители повреждений – микроскопические грибы, на долю которых приходится до 50 % от общего числа биоповреждений.

Одним из наиболее эффективных способов борьбы с микроскопическими грибами – вредителями и разрушителями древесины является применение различных химических веществ, оказывающих антисептическое действие. В связи этим одной из важных задач в области изучения проблемы биологических повреждений и разрушения древесины микроорганизмами является поиск новых эффективных и безопасных антисептиков.

Было исследовано две группы веществ, разделенных на по основному действующему агенту: четвертичные аммониевые соли и Су-содержащие соединения. В качестве раствора сравнения использо-

вался коммерческий транспортный антисептик для древесины – Просепт-42, следующего состава: фенолят натрия (CAS № 139-02-6); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (CAS № 1303-96-4); 2-октил-3(2H)-изотиозолон (CAS № 26530-20-1). Контроль – стерильная дистиллированная вода. Исследования проводили по ГОСТ 30704-2001. Объектами служили музейные культуры грибов, относящихся к разным классам и разные по типу метаболизма: *Polyporus versicolor* (*Trametes versicolor*), *Aureobasidium pullulans*, *Stemphylium botryosum*, *Fomitopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus*. С поверхности зараженных спилов, предоставленных «ЛДК Игирма» (п. Новая Игирма) был выделен микромицет, охарактеризованный как гриб синевы. Идентификация микроорганизма не проводилась. Гриб отличается высокой агрессивностью по отношению к древесине, активно колонизирует любой древесный субстрат.

Проведенные нами эксперименты показали, что Просепт-42 проявляет хорошие фунгицидные свойства относительно большинства исследованных грибов, однако выделенный нами гриб синевы и *L. sulphureus* плохо поддаются обработке (табл. 1).

Таблица 1

Сохранность древесины при обработке фунгицидами

Антисептик	% действующего вещества	гриб					
		<i>Trametes versicolor</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Stemphylium botryosum</i>	<i>Fomitopsis pinicola</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Гриб синевы
Контроль		–	–	–	–	–	–
Просепт-42	1:19	+++	++	+++	+++	+	+
Cu-содержащие соединения							
ПАК	1	+	+	не опр.	–	–	–
Куприл	0.5	+	+	не опр.	–	–	–
	1	+	++	не опр.	–	+	–
	2	+	++	не опр.	–	+	–
Ликуприл	1	+	–	–	++	++	не опр.
	2	+	–	не опр.	++++	++	++
Арабиногалактан-Су	1	–	–	не опр.	+	–	–
Четвертичные аммониевые соли							
АДБАХ	1	++++	++	не опр.	+	+++	++
Анавидин	1	++	+++	++++	+++	+++	не опр.
	2	++++	+++	не опр.	+++	+++	++
Арквад	1	+++	++++	не опр.	++++	++++	+++

Нами были исследованы Cu-содержащие полимеры различной природы. На первом этапе была проверена фунгицидная активность самого полиакрилата, которая крайне мала. Введение в полимерную матрицу 5 % меди (куприл) лишь незначительно увеличила данную активность. Тогда как полимер, содержащий 5 % меди и 5 % лития (ликуприл) проявил очень хорошие фунгицидные свойства. Так, 2 % раствор ликуприла практически полностью подавляет рост *F. pinicola*. Препарат также активен против гриба синевы и *L. sulphureus*, септирование которых Просепт-42 не дает значимого эффекта. Отсутствие подавления роста *T. versicolor* скорее всего связано с наличием системной устойчивости данного гриба к препаратам меди.

Замена полиакрилатной матрицы на природный водорастворимый полимер арабиногалактан приводит к практически полной потере активности. Это, вероятно, связано с тем, что арабиногалактан является хорошим пищевым субстратом для грибов, что приводит к его быстрому разрушению и инактивации меди.

В качестве четвертичных аммониевых солей были взяты три соединения алкилдиметилбензиламмоний хлорид (АДБАХ), диметилдидецил аммония хлорид (торговое название – arquad 2.10-50, далее – Арквад), полигесаметилenguанидин фосфат (торговое название – анавидин). Все они проявили высокую и очень высокую активность относительно всех исследуемых грибов. Для некоторых микроорганизмов эта активность значительно превышала активность Просепта-42.

Гравиметрический анализ показал (табл. 2), что Просепт-42 лучше всего работает против *T. versicolor* и *S. botryosum*, однако менее активен относительно грибов бурой гнили и синевы. Это подтверждают визуальные наблюдения степени зарастания древесины. Наиболее перспективным по данным гравиметрии выглядит ликуприл, способный сохранять 55,9–89,6 % древесины. Активность анавидина в основном проявилась в защите от гриба белой гнили (*T. versicolor*), но сохранность древесины от остальных исследуемых грибов также оставалась высокой.

Таблица 2

Сохранность древесины при обработке фунгицидами
(% от контроля – стерильная вода)

Антисептик	Гриб					Среднее по грибам
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Stemphylium botryosum</i>	<i>Fomitopsis pinicola</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i>	
Просепт-42	69	44,8	65,3	47,1	39	53
Ликуприл 2 %	72,5	85,8	89,6	55,9	66	74
Анавидин 1 %	70,7	45,8	45,6	50	47,8	52

Была исследована возможность обработки исследуемыми веществами сильно зараженных спилов сосны, предоставленных «ЛДК Игирма». Обработка проводилась путем замачивания спилов в антисептике на 30 мин. Затем спилы помещались в стерильные полиэтиленовые пакеты. Через две недели со спилов производили смыв стерильной водой. 50 мкл смывных вод вносили в чашки Петри с питательной средой Сабуро и инкубировали в термостате при 26 °С неделю. Результаты оценивали визуально по количеству и разнообразию колоний без определения видового состава микроорганизмов. В контроле визуализируются 5–6 доминирующих грибов, зарост максимален, весь агар полностью покрыт гифами грибов. На уровне Пропепт-42 работают четвертичные аммониевые соли. При обработке данными соединениями высевается 2–3 вида грибов с небольшим заростом агара. Минимальный зарост характерен для обработки ликуприлом в концентрации 2 %.

НАНОКОМПОЗИТЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ И БЕЗОПАСНЫЙ СПОСОБ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

И. А. Граскова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: graskova@sifibr.irk.ru

Различные заболевания культурных растений, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями, широко распространены в современном растениеводстве. Бактерии рода *Clavibacter* поражают широкий круг культурных и сорных растений. Одним из представителей этого рода является *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) – возбудитель кольцевой гнили картофеля, и на сегодняшний день не существует эффективных способов борьбы с ним. Более того, в настоящее время отсутствуют химические и биологические агенты, способные ограничивать распространение бактериальных болезней картофеля. Необходимо разработать эффективные против бактерий и безопасные для растений агенты для оздоровления картофеля от фитопатогенной грамположительной бактерии *Cms* с применением препаратов на основе природных соединений. В последнее время актуальными являются разнообразные антисептические нанокompозитные субстанции, у которых эффективные антимикробные свойства могут задаваться как наночастицами,

так и специфическими бактериотропными полимерами, входящими в состав нанокompозитов. В последнем случае можно направленно создавать антимикробные нанокompозиты с целевой трофической доставкой наночастиц к микробным клеткам.

В настоящей работе продемонстрирован экологически безопасный способ оздоровления картофеля от бактериального патогена с помощью разработанных в Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского СО РАН нанокompозитов, и выявлено их влияние на жизнеспособность бактерий *Cms* и биометрические показатели картофеля *in vitro*. Исследования проводили на бактериях *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* штамм Ac-1405, полученного из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пущино. Синтез нанокompозита селен/крахмал (НК Se/K) проводили из крахмала с добавлением H_2SeO_3 . Синтез нанокompозита селен/арабиногалактан проводили из арабиногалактана и SeO_2 . Синтез нанокompозитов гуминовые вещества/серебро проводили из гуминовых веществ (ГВ), которые выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из грязей озера Гурван Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений. Синтез нанокompозита селена и каррагинана из готового препарата каррагинана, водорастворимого сульфатированного полисахарида, макромолекула которого состоит из регулярно чередующихся остатков 3-*O*-замещенной β -*D*-галактопиранозы с заместителем в виде сульфогруппы в положении 4 и 4-*O*-замещенной 3,6-ангидро- α -*D*-галактопиранозы.

Было показано, что нанокompозиты влияют на морфологию бактериальных клеток, что свидетельствует о наличии неблагоприятных условий для бактерии. Вероятно, при этом происходит нарушение осмотического статуса бактериальной клетки, и она меняет свою морфологию, превращаясь в менее вытянутую структуру. Наблюдаемый эффект снижения прироста бактерий и изменение их морфологии после инкубации с нанокompозитами, вероятно, связан с локальными деструктивными изменениями клеточной стенки бактерий. Было показано изменение жирно-кислотного состава бактерий после инкубации с нанокompозитами селена и арабиногалактана, при этом наблюдалось увеличение количества насыщенных жирных кислот. Такое изменение приводит к нарушению жидкостно-кристаллических свойств клеточных мембран бактерий, что в свою очередь, может менять способность бактериальных клеток к агрегации, изменять их форму и даже приводить к разрушению клеточных мембран и гибели бактерий. Также более подробные исследования с использова-

нием электронной микроскопии позволили нам обнаружить факт прикрепления наночастиц к поверхности бактериальной клетки, что, вероятно, приводит к нарушению ее окислительно-восстановительного потенциала.

В естественных условиях бактерии обычно испытывают недостаток питательных веществ, поэтому возможно применение изученного нанокompозита как носителя с адресной доставкой частиц селена, при использовании которых бактериями в качестве питательного средства впоследствии происходит нарушение их жизнедеятельности и гибель бактериального патогена. Результаты визуализации взаимодействия микробных клеток и НКSe позволяют предположить, что механизм действия нанокompозита на бактериальные клетки связан с изменением их мембранной проницаемости. Было обнаружено, что НКSe/АГ усиливает образование АФК в клетках инфицированного возбудителем кольцевой гнили картофеля. Вероятно, это объясняется тем, что нанокompозит способен активировать в растении защитные механизмы для борьбы со стрессом. Известно, что АФК являются сигнальными молекулами, и повышение их концентрации приводит к активации множества защитных программ клетки при стрессах как биотической, так и абиотической природы (Suzuki et al., 2012; Lehmann et al., 2015; Choudhury et al., 2017; Liebthal, Dietz, 2017). Наблюдаемая картина повышенного содержания АФК при добавлении нанокompозита может свидетельствовать об ускоренной активации защитной реакции на стресс, вызванный инфицированием бактерией.

Представленные данные характеризуют полученные наноматериалы как потенциальные низкодозные антибактериальные агенты для лечения и профилактики заболеваний сельскохозяйственных растений, вызванных фитопатогенном *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Литература

- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // Plant Cell Environ. 2012. Vol. 35, N 2. P. 259–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
- Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // Plant J. 2017. Vol. 90, N 5. P. 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Liebthal M., Dietz K. J. The Fundamental Role of Reactive Oxygen Species in Plant Stress Response // Methods Mol Biol. 2017. Vol. 1631. P. 23–39. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7136-7_2

ТРАНСФОРМАЦИЯ СТЕРЕОИДОВ ГРИБАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ, ИЗОЛИРОВАННЫМИ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕЕ

А. А. Жгун¹, М. П. Потапов^{1,2}, Н. В. Карпова¹
В. В. Ядерц¹, Д. А. Кардонский³

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Бионженерии им. К. Г. Скрябина
Москва, e-mail: office@biengi.ac.ru

²ПушГЕНИ, г. Пушкино, e-mail: uu@pushgu.ru

³ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России
Москва, e-mail: info@rcpcm.org

Микроорганизмы способны расти на субстратах самой разнообразной природы. Одна из наиболее практически-значимых ниш обитания, с точки зрения сохранения объектов культурного наследия, может ими занимать благодаря возможности расти на предметах изобразительного искусства, таких как темперная живопись или масляная живопись на холсте. В современных музеях мира существует строго регламентированная консервация, направленная на обеспечение защиты экспонатов от биологического поражения, в частности, соблюдается четкий температурно-влажностный режим. В таких условиях объекты культурного наследия защищены от большинства микроорганизмов, однако происходит селекция экстремофилов, в частности, ксерофильных организмов, способных развиваться в условиях повышенной сухости музейного хранения.

В основном историческом здании Государственной Третьяковской галереи, ГТГ (г. Москва, Лаврушинский переулок, 10) с середины XIX в. невольно происходил такой отбор. Микробиом подвергался как постоянной консервации, так и реставрации. Параллельно шла селекция на возможность использовать в качестве питательного субстрата органические материалы, которые находятся как в составе самого исторического здания, так и экспонатов. Квалифицированная работа ведущих специалистов музейного хранения подавляло «проявление» самого факта существования этого отселектированного «спящего» микробиома, способного эффективно расти на иконах и картинах. Редкие локальные отклонения, связанные, например, с кокерами, влажностными карманами, которые периодически возникают во всех музеях мира, приводили к локальным биопоражениям; их своевременно реставрировали.

В предыдущей работе, с разрешения Т. С. Городковой, главного хранителя музейных предметов ГТГ, в залах древнерусского искусства основного исторического здания с экспонатов и поверхностей

помещений мы отобрали свыше ста проб в залах Домонгольского периода (№ 56), Ростово-суздальской школы живописи (№ 57) и Иконописи XVI–XVIII вв. (№ 61) [Zhgun et al., 2020]. Характеристику микробиомов в исходных пробах и полученных на их основе культурах провели после метагеномного секвенирования гипервариабельных районов рДНК бактерий (V3/V4) и грибов (ITS2) на платформе MiSeq Illumina, номер доступа BioProject: PRJNA606688, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA606688>. Доминантными представителями оказались 10 видов плесневых грибов. Их выделили в чистые линии; показали, что они представляют потенциальную опасность для произведений изобразительного искусства ГТГ, поскольку в экспериментах по заражению макетов, созданных на основе органических материалов, используемых в темперной живописи и научной реставрации, продемонстрировали эффективную биодеструкцию большинства материалов. Наиболее активный рост проявлялся на макетах с темперными красками [Zhgun et al., 2020].

Поскольку темперные краски получают на основе яичного желтка, являющегося одним из самых богатых источников холестерина в природе (до 2 % от сухой массы), а в процессе старения темперных материалов изменения в холестерине не затрагивают коровую структуру стероидного ядра, выделенная нами группа грибов-деструкторов темперной живописи видится как перспективный объект для скрининга их возможных стероид трансформирующих активностей. В связи с этим целью нашей работы было определение способности трансформировать фармацевтически-значимые стероиды доминантными грибами-деструкторами темперной живописи, изолированными ранее в ГТГ: *Aspergillus versicolor* STG-25G, *Ulocladium sp.* AAZ-2020a STG-36, *Cladosporium halotolerans* STG-52B, *Aspergillus creber* STG-57, *Aspergillus versicolor* STG-86, *Aspergillus creber* STG93W, *Cladosporium parahalotolerans* STG-93B, *Simplicillium lamellicola* STG-96, *Microascus paisii* STG-103 и *Aspergillus protuberus* STG-106.

Биотрансформационную активность определяли I) в состоянии роста культур на среде F (г/л: сахароза 30, дрожжевой экстракт 5, NaNO₃ 2, (NH₄) H₂PO₄ 3, KCl 0.5, MgSO₄ x 7H₂O, pH 5,5 – 6,0) по отношению к андростендиону (АД) и андростендиендиону (АДД) и II) в 0.15 М калий-фосфатном буфере (pH = 6.0) по отношению к АД. Отбор проб проводили через 24, 48, 72 ч после внесения в питательную среду АД и АДД. Стероиды экстрагировали из проб этилацетатом и анализировали методами тонкослойной хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии. Для идентификации соединений по полученным масс-спектрам использовали базы данных NIST 2014 (<https://doi.org/10.1007/s13361-016-1589-4>) и Reaxys

(<https://www.reaxys.com>). В качестве контроля использовали промышленной штамм *Curvularia lunata* ВКПМ-F981 [Andryushina et al., 2013].

Для всех скринированных штаммов мицелиальных грибов выявили способность трансформировать изучаемые стероидные субстраты с той или иной степенью эффективности (т. е., количества переработанного исходного субстрата) и селективности. Наиболее эффективно, на уровне, близком к контрольному штамму *C. lunata* ВКПМ-F981, трансформацию проводили *S. lamellicola* STG-96 и *C. parahalotolerans* STG-93В. Селективную трансформацию показали *A. versicolor* STG-25G и *A. versicolor* STG-86 при трансформации АД в тестостерон. Также селективно трансформировал *M. paisii* STG-103 АДД в тестолактон, ингибитор ароматазы, клинически используемый для лечения эстроген-зависимого рака молочной железы. Найденные активности могут иметь в дальнейшем биотехнологическое применение.

Всего в работе охарактеризовали 33 стероида, образующихся при трансформации АД, для 19-ти из них установили структуру, что позволило охарактеризовать протекающие реакции: I) гидроксильирования в положения 6 β , 11 α , 14 α и 15 α , II) оксидоредуктазную активность в положение 17 с образованием тестостерона, III) 5 β редуктазную активность, IV) C-1/C-2 дегидрогеназную активность с образованием андростадиендиона (АДД) и V) другие модификации, связанные как первичной трансформацией АД, так и с последующими модификациями образующихся промежуточных продуктов. Также охарактеризовали 30 стероидов, образовавшихся при трансформации АДД, для 5-ти из них установили структуру.

Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что грибы-деструкторы теплой живой природы обладают стероид-трансформирующей активностью и являются перспективными микроорганизмами для скрининга биотехнологически-значимых трансформаций стероидов с дальнейшей целью промышленного использования.

Литература

Andryushina V. A., Voishvillo N. E., Druzhinina A. V., Stytsenko T. S., Yaderets V. V., Petrosyan M. A., Zeinalov O. A. 14 α -Hydroxylation of steroids by mycelium of the mold fungus *Curvularia lunata* (VKPM F-981) to produce precursors for synthesizing new steroidal drugs. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013. 47(2). P. 103–108.

Zhgun A., Avdanina D., Shumikhin K., Simonenko N., Lyubavskaya E., Volkov I., Ivanov V. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. *PLOS ONE*. 2020. 15(4), e0230591.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *AFT1* И *FRE-FIT* КЛАСТЕРА С ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬЮ ГОМЕОСТАЗА ЖЕЛЕЗА У ДРОЖЖЕЙ САХАРОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ВИНА ТИПА «ХЕРЕС»

Д. А. Авданина¹, С. А. Кишковская², Т. Н. Танащук²
Е. В. Иванова², М. Ю. Шаламитский², В. И. Загоруйко²
Н. В. Равин¹, А. В. Марданов¹, М. А. Эльдаров¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

²Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия “Магарач” РАН», Ялта
e-mail: daria.avdanina@biengi.ac.ru

Уникальные органолептические свойства хересных вин приобретаются в результате сочетания нескольких факторов – выращивание сортов белого винограда, характерных для конкретного географического региона, выдерживание виноматериала в дубовых бочках, специфическая работа хересных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, способных к образованию пленки и окислению этанола в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы. Так, например, известно, что «хересный» регион Испании имеет специфический климат: лето сухое и жаркое, однако с Атлантического океана постоянно поступает влажный воздух. Одной из важных особенностей удержания влаги в почвах является их состав: мел, известняк и глина, недаром этот регион называется Альбариса, что в переводе означает «белый». Мел прекрасно впитывает воду и затем медленно отдает ее корням виноградной лозы, известняк и глина также хорошо удерживают влагу. Вместе с тем изучение винодельческих характеристик «хересных» штаммов дрожжей наталкивает на мысль об уникальности их геномного строения. Можно предположить, что исторически хересные дрожжи селектировались на виноматериале с почв, обедненных железом [Paneque et al., 2009]. Данные биохимических и генетических исследований [Outten et al., 2013] позволили идентифицировать гены гомеостаза железа у *S. cerevisiae* и проследить динамику их экспрессии в ответ на изменение содержания железа во внешней среде. А в работе [Eldarov, 2018] был выявлен полиморфизм генов гомеостаза железа при сравнительном геномном анализе «винных» и «хересных» штаммов

S. cerevisiae. Как известно, поддержание гомеостаза железа в клетке является важной функцией всех живых микроорганизмов. В то же время, избыток железа может быть токсичен, приводя к повреждению клеточных мембран, белков, нуклеиновых кислот. В работе [Eldarov, 2018] анализ полного генома трех штаммов хересных дрожжей показал, что делеция участка хромосомы XV у правого плеча длиной около 14 тыс. п. н. у изученных штаммов приводит к удлинению *FRE-FIT* кластера, кодирующего гены железоредуктаз *FRE3* и *FRE5*, а также *FIT2-FIT3* гены GPI-заякоренных мембранных белков, отвечающих за удержание в клеточной стенке железа, связанного с сидерофорами [Protchenko, 2001].

Целью данной работы было определение взаимосвязи полиморфизма гена *AFT1* и *FRE-FIT* кластера с фенотипической вариабельностью гомеостаза железа у дрожжей сахаромикетов – продуцентов вина типа «херес». Уровень чувствительности дрожжевых штаммов, предварительно выращенных на среде YPD (1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 2 % глюкозы), к железу определяли после засева ночных культур в соотношении 1:50 в 5 мл среды SD (0,67 % дрожжевых азотистых оснований, 2 % глюкоза) с двумя вариантами концентраций Fe^{2+} (0,1 и 4 мМ). Культивирование проводили 36 ч на шейкере-инкубаторе при 26 °С. По окончании выращивания определяли оптическую плотность (OD) при 600 нм. Индекс железочувствительности находили как частное от деления показателей OD_{600} на средах с 0,1 и 4 мМ Fe^{2+} . Для молекулярно-генетической идентификации и отнесения к «винным» или «хересным» штаммам использовали метод анализа ПЦР-фрагментов участка 5.8S-ITS повтора рДНК. Констатацию наличия «делеционного» полиморфизма в промоторе гена *FLO11* проводили по методике, описанной ранее [Alexandre, 2013]. Далее анализировали SNP полиморфизм гена *AFT1*; полиморфные аллели секвенировали методом Сэнгера на ABI 3730. Также проводили идентификацию «делеционного» полиморфизма *FRE-FIT* кластера в правом плече хромосомы XV с регистрацией «хиимерного» гена *FRE3/FRE2* после анализа секвенированных данных. Для определения взаимосвязи между наличием исследуемых полиморфизмов и чувствительности дрожжей к железу проводили определение уровня накопления внутриклеточного железа в сухой биомассе после культивирования штаммов на средах с 0,1 и 3 мМ Fe^{2+} .

Полученные данные подтвердили предположение, что «железочувствительные» штаммы со стимулирующим влиянием «хересных» вариантов аллелей *AFT1* и *FRE-FIT* способны хорошо поглощать же-

лезо при его низкой концентрации в среде. В то время как «железостойчивые» штаммы с «винным» вариантом аллелей *AFT1* и *FRE-FIT* лучше накапливали железо при его высокой концентрации в среде (табл.).

Таблица

Средняя концентрация железа в клетках дрожжей с «хересным» и «винным» вариантами локусов *AFT1* и *FRE-FIT* при культивировании на средах с различным содержанием железа, мкг/г

Концентрация Fe ²⁺ в среде, мМ	Концентрация Fe ²⁺ в клетках «хересных» дрожжей, мкг/г	Концентрация Fe ²⁺ в клетках «винных» дрожжей, мкг/г
0,1	570	270
3	2,2·10 ³	3,6·10 ³

Железо в винном материале – необходимый элемент для хересования вина, участвует в глубинных окислительных процессах, способствует накоплению альдегидов, стимулирует рост и адгезию дрожжевых клеток при формировании пленки [Саенко и др., 1974]. В данной работе нам удалось показать, что «железочувствительность» можно рассматривать как одну из физиологических характеристик хересных штаммов, а полиморфизм локусов *AFT1* и *FRE-FIT* – как их полезный генетический маркер.

Литература

- Alexandre H. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* – their ecology, genetics and metabolism // Int. J. Food Microbiol. 2013. Vol. 167. P. 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>
- Eldarov M. A., Beletsky A. V., Tanashchuk T. N., Kishkovskaya S. A., Ravin N. V., Mardanov A. V. Whole-genome analysis of three yeast strains used for production of sherry-like wines revealed genetic traits specific to flor yeasts // Front. Microbiol. 2018. Vol. 9. P. 965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00965>
- Outen C. E., Albetel A.-N. Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details // Curr. Opin. Microbiol. 2013. Vol. 16. P. 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2013.07.0204>
- Paneque P., Álvarez-Sotomayor M. T., Gómez I. A. Metal contents in “oloroso” sherry wines and their classification according to provenance // Food Chem. 2009. Vol. 117. P. 302–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.006>
- Protchenko O., Ferea T., Rashford J., Tiedeman J., Brown P. O., Botstein D., Philpott C. C. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 49244–49250. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109220200>
- Саенко Н. Ф., Шур И. М., Киселевская Р. М. Влияние железа на процесс хересования вина // Виноделие и виноградарство СССР. 1974. Т. 4. С. 16–19.

ПОИСК И АНАЛИЗ САЙТОВ И СТРУКТУР CRISPR-CAS СИСТЕМ В ГЕНОМАХ ПЛАЗМИД *BACILLUS THURINGIENSIS* И ИХ ФАГОВЫХ АНТАГОНИСТОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ТАРГЕТНОЙ ФАГОТЕРАПИИ

Н. А. Арефьева¹, Ю. П. Джиоев², А. Ю. Борисенко²,
Л. А. Степаненко², В. П. Саловарова¹, Г. В. Юринова¹,
А. А. Приставка¹, Г. А. Тетерина¹, О. Ф. Вятчина¹, Ю. А. Маркова³,
В. И. Злобин²

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск

²Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

³Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

Введение. CRISPR-Cas – адаптивная иммунная система бактерий и архей, обеспечивающая им защиту от вирусной ДНК или РНК. Информация о фагах, к которым бактерия имеет «иммунитет» записана в спейсерах – фрагментах чужеродной ДНК/РНК, интегрированных между палиндромными повторами в CRISPR кассеты. В данной работе представлен биоинформатический алгоритм анализа CRISPR-Cas систем и детекции фагов через спейсеры CRISPR кассет на примере бактерии *Bacillus thuringiensis*. Раньше считалось, что *B. thuringiensis* не является патогеном человека, однако в последнее время подтверждена ассоциация этого микроорганизма с различными инфекционными заболеваниями у человека. [Francesco Celandroni et al., 2014]. Кроме того, было доказано, что некоторые фаги *B. thuringiensis* могут также лизировать штаммы патогенных *B. Anthracis* и *B. cereus* [Yihui et al., 2018]. Таким образом, знание о фагах *B. thuringiensis* может предоставить ресурсы для борьбы с данными патогенами [Nakonieczna et al., 2018].

Материалы и методы. Согласно информации, представленной в базе данных CRISPRCasdb, у *B. thuringiensis* CRISPR-Cas системы расположены в плазмидах. Таким образом, материалом для исследования стали геномы плазмид, из базы данных FTP NCBI (обновление на октябрь 2020 г.). При помощи скрипта, написанного на Python 3, было выделено 379 плазмид *B. thuringiensis*. Для поиска *cas*-генов были проаннотированы открытые рамки считывания с использованием программы Prodigal 2.6.3. С помощью алгоритма HmmSearch, входящей в программный пакет HMMER 3.3.1. и HMM-профилей Cas-белков из базы данных TIGRFAM, были определены *cas*-гены. Параметры HmmSearch были оставлены по умолчанию. Далее, на основе сигнатурных *cas*-генов, был установлен тип и подтип найденных CRISPR-Cas систем, согласно классификации [Makarova et al., 2018].

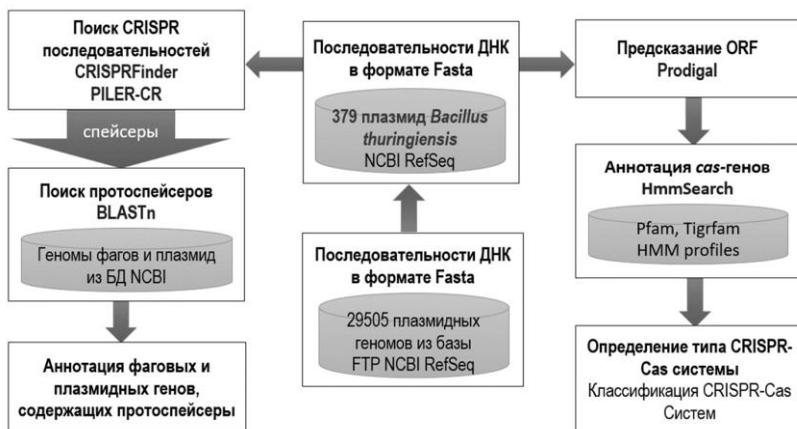


Рис. 1. Общая схема биоинформатического анализа

Для детекции CRISPR кассет в геномах плазмид были использованы программы CRISPRFinder и PILER-CR. Из найденных CRISPR кассет были выделены спейсеры, из которых спейсеры с уникальной последовательностью были собраны в multi-fasta файл. Поиск протоспейсеров был проведен с помощью алгоритма BLASTn против фаговых геномов, скачанных с базы данных NCBI. Если протоспейсер был обнаружен в области белка – предоставлялась аннотация белка. Общая схема исследования представлена на рис. 1.

Результаты. CRISPR-*cas* локусы найдены в 18 конъюгативных плаزمидах (размерами 94695-761374 п.н.) из 379 анализируемых. Идентифицировано два варианта CRISPR-Cas систем, принадлежащие подтипу I-B и подтипу I-C. В 17 плазмидах идентифицированы CRISPR-Cas системы подтипа I-C, из которых только в трех плазмидах в CRISPR-*cas* локусе имеется полный набор *cas*-генов (эффекторные гены: *cas3*, *cas5*, *cas8*, *cas7* и адаптационные гены: *cas4*, *cas1*, *cas2*). В остальных 14 отсутствовали адаптационные гены адаптационного модуля в связи с чем данные системы не могут приобретать новые спейсеры, но способны к транскрипции CRISPR каскеты, распознаванию и уничтожению ДНК мишени. Кластер *cas*-генов системы I-C фланкирован 2-3 CRISPR каскетами, количество спейсеров в которых варьирует от 3 до 29. В трех плазмидах были обнаружены локусы CRISPR-Cas системы подтипа I-B (эффекторные гены: *cas6*, *cas8*, *cas7*, *cas5*), в которых отсутствуют адаптационные гены.

CRISPR кассет рядом с данными системами не обнаружено. Система CRISPR-Cas I-B может находиться в плазмиде совместно с системой I-C или быть единственной в геноме. Выявлено 105 уникальных спейсеров. К 14 спейсерам найдены протоспейсеры фагов (18 различных фагов) (рис. 2). Протоспейсеры фагов в основном локализованы в гене, кодирующий главный капсидный белок бактериофага.

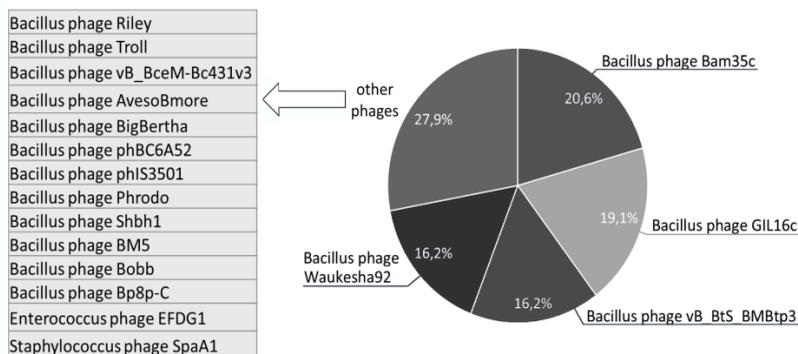


Рис. 2. Выявленные через спейсеры CRISPR-кассет фаги

Вывод. Таким образом, выявленные фаги в перспективе могут быть применены при создании терапевтических фаговых препаратов против патогенных штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, однако потребуются дополнительные экспериментальные исследования для подтверждения их способности лизировать данные патогены.

Литература

- Celandroni F., Salvetti S., Senesi S., Ghelardi E. *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells // FEMS Microbiol Lett. 2014. Vol. 361, N 2. P. 95–103.
- Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V. Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: where from here? // CRISPR-J. 2018. Vol. 1, N 5. P. 325–336.
- Nakonieczna A., Cooper C. J., Gryko R. Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria // J. Appl. Microbiol. 2015. Vol. 119, N 3. P. 620–631.
- Yihui Y., Peng Q., Yang S. et al. Isolation of a novel *Bacillus thuringiensis* phage representing a new phage lineage and characterization of its endolysin. // Viruses. 2018. Vol. 10, N 11. P. 611.

БАКТЕРИИ *OCHROBACTRUM CICERI* – ПРОДУЦЕНТ ПАВ

Е. С. Бабусенко¹, К. И. Киенская², Е. А. Клейменова²,
В. А. Крисанова², И. А. Буторова²

¹ООО «ГИПРОБИОСИНТЕЗ», Москва, e-mail: lbabus@mail.ru

²Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева
Москва, e-mail: kienskaya@muctr.ru, iabut@mail.ru

Поиск новых штаммов микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты, выбор новых видов сырья для их производства, изучение свойств этих соединений, остается на сегодняшний день актуальной задачей, поскольку позволяет не только обнаружить новые ПАВ с функциональными свойствами, но и открывает возможности для удешевления технологии их получения [Гоготов, 2006; Куюкина, 2007; Пирог, 2004].

Объектом исследования служил штамм бактерий *Ochrobactrum ciceri* ВСБ-947, предоставленный компанией ООО «Экобио». Штамм природный, выделен из нефтешламов в Ханты-Мансийского Автономном Округе, идентифицирован в НАЦИОНАЛЬНОМ БИОРЕСУРСНОМ ЦЕНТРЕ Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика по 16S р РНК. Заключение о непатогенности получено в Московской испытательной лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (МИЛ ФГБУ ЦНМВЛ).

Штамм *Ochrobactrum ciceri* был выделен из нефтешламов при температуре 10 °С и в дальнейшем в лабораторных условиях адаптирован к более высокой температуре 30 °С, что привело к изменению культуральных признаков при росте штамма на агаризованной питательной среде.

Исследована способность штамма расти и синтезировать ПАВ на гидрофобных и гидрофильных субстратах при температуре 30 °С. Как показали исследования, для штамма *Ochrobactrum ciceri* лучшими субстратами для роста и синтеза ПАВ служат гидрофильные субстраты (табл.).

Сравнительные исследования условий культивирования, оценка активности роста и синтеза ПАВ штаммом *Ochrobactrum ciceri* ВСБ-947 на гидрофильных субстратах позволили выбрать для дальнейших исследований этиловый спирт в качестве единственного источника углерода и энергии.

Таблица

Рост бактерий *Ochrobactrum ciceri* ВСБ-947 и образование био-ПАВ
на различных субстратах

Показатели	Виды субстрата					
	Л-бульон (контроль)	n-декан	дизельное топливо	глюкоза	глицерин	этиловый спирт
D, оптическая плотность	2,80	0,23	0,72	2,73	2,69	1,72
E ₂₄ ,%	8,0	–	–	23,1	14,3	30,0

Проведенные исследования показали, что на этиловом спирте штамм *Ochrobactrum ciceri* синтезирует связанные с клетками ПАВ гликолипидной природы.

Методами тензиометрии и кондуктометрии исследованы коллоидно-химические свойства полученного ПАВ [Nazarov, 2019]. Установлено, что данное ПАВ проявляет относительно высокую поверхностную активность, что позволяет снижать поверхностное натяжение водных растворов до 50 мН/м. При этом в водных растворах наблюдаются процессы ассоциации, сходные с мицеллообразованием. На кривой зависимости электропроводности от концентрации ПАВ наблюдается четкий перегиб, соответствующий критической концентрации ассоциации – ККА = 0,2 % масс.

Полученные результаты исследований открывают возможности для получения ПАВ гликолипидной природы на основе штамма бактерий *Ochrobactrum ciceri* ВСБ-947 с высокой эмульгирующей активностью, которые могут найти применение в экологии, фармакологии, медицине и других областях хозяйственной деятельности человека.

Литература

Гоготов И. Н., Белоножкин С. В., Ходаков Р. С., Шкидченко А. Н. Биосурфактанты: продуценты, свойства и практическое использование // Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность : материалы 3-й Международной конференции. Пущино : Биоресурсы и экология, 2006. С. 104–111.

Куюкина М. С. Биосурфактанты актинобактерий рода *Rhodococcus*: индуцированный биосинтез, свойства, применение : автореф. дис. ... д-ра биол. наук.

Nazarov V. V., Grodsky A. S., Shabanova N. A., Gavrilova N. N., Belova I. A., Zhilina O. V., Kienskaya K. I., Krivoshchepov A. F. Colloidal chemistry. Workshop and problem book: study guide. SPb. : Lan, 2019.

Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Карпенко Е. В. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* штамм ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. С. 544–550.

АДАПТАЦИЯ РОДОКОККОВ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ФАРМПОЛЛЮТАНТА ИБУПРОФЕНА

Г. А. Бажутин, Е. А. Тюмина, И. Б. Ившина

Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь
e-mail: ivshina@iegm.ru

Ибупрофен – широко применяемый в медицине и ветеринарии нестероидный противовоспалительный препарат, который повсеместно детектируют в поверхностных, грунтовых и очищенных сточных водах в концентрациях от нескольких нг/л до 6,000 мкг/л, а также регулярно обнаруживают в образцах питьевой воды [aus der Beek et al., 2016; Chopra, Kumar, 2020]. Одними из микроорганизмов, осуществляющих процессы естественного самоочищения от антропогенных ксенобиотиков, в том числе фармполлютантов, являются родококки – типичные обитатели водных и почвенных экосистем, обладающие наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов и широким спектром адаптационных возможностей [Ivshina et al., 2017; Anteneh and Franco, 2019]. Однако сведения по микробной конверсии и механизмам запускаемых защитных реакций бактерий на присутствие фармполлютантов немногочисленны.

В работе использовали штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1278 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, www.iegmcol.ru, реестровый номер Уникальной научной установки 73559, имеет статус Центра коллективного пользования, <http://www.ckp-rf.ru/ckp/480868/>). Клетки выращивали в минерально-солевой среде RS в присутствии 50 или 100 мг/л ибупрофена [Catalogue of Strains ... , 2022]. В качестве дополнительного источника углерода использовали 0,1 об. % *n*-гексадекан. Каталазную и супероксиддисмутазную активность, а также перекисное окисление липидов определяли спектрофотометрически согласно протоколам производителя (Sigma-Aldrich, США). Измерение дзета-потенциала (ζ -потенциал) бактериальных клеток проводили методом динамического светорассеяния с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZetaSizer, v. 2.2. Изменение проницаемости клеточных мембран под воздействием ибупрофена определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым.

По нашим данным, присутствие ибупрофена в среде индуцировало окислительный стресс у бактериальных клеток, о чем свидетельствовали смещение показателей каталазной и супероксиддисмутазной активности, а также липидной пероксидации. Оксидативный стресс запускает аномалии в морфометрических и физико-химических параметрах клеточной поверхности. Так, изначальные значения электрокинетического потенциала клеточной поверхности родококков равнялись -25.1 ± 1.4 мВ. На 4 сут. культивирования в присутствии ибупрофена ζ -потенциал родококков ($-35,3 \pm 2,4$ мВ) был значительно (на 10 единиц) ниже в сравнении с биотическим контролем ($-25,5 \pm 0,7$ мВ). Смещение ζ -потенциала в область более отрицательных значений может свидетельствовать о защитном механизме клеток на присутствие более токсичных продуктов метаболизации ибупрофена. Ранее нами было показано, что увеличение отрицательности электрокинетического потенциала свидетельствует об усиленной клеточной агрегации родококков в ответ на присутствие токсичного и устойчивого диклофенака [Ivshina et al., 2019]. В данном случае также отмечалась тенденция к образованию клеточных агрегатов. Кроме того, более отрицательный заряд клеток может являться признаком изменения проницаемости клеточных мембран у бактерий [Halder et al., 2015]. В присутствии ибупрофена по мере увеличения отрицательности ζ -потенциала клеток, снижалась проницаемость их клеточных мембран. Полученные данные о формировании клеточных агрегатов, смещении ζ -потенциала в область более отрицательных значений и снижении мембранной проницаемости рассматриваются нами в качестве механизмов адаптации родококков и, как следствие, повышения их устойчивости к воздействию ибупрофена.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 21-14-00132 с использованием оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Литература

- Anteneh Y. S., Franco C. M. M. Whole cell Actinobacteria as biocatalysts // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 77.
- aus der Beek T., Weber F. A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küster A. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016. Vol. 35. P. 823–835.
- Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. [cited 6 May 2021]. URL: <http://www.iegmc.org/strains/index.html>
- Chopra S., Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation // *Heliyon*. 2020. Vol. 6. P. e04087.

Halder S., Yadav K. K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Haldar S., Karmakar S., Sen T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents // Springerplus. 2015. Vol. 4. P. 672.

Ivshina I. B., Kuyukina M. S., Krivoruchko A. V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // Microbial Resources / ed. I. B. Kurtböke. London : Elsevier, 2017. P. 121–148.

Ivshina I. B., Tyumina E. A., Kuzmina M. V., Vikhareva E. V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. P. 9159.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ БЫСТРОГО СКРИНИНГА ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

А. А. Бычкова, Ю. В. Зайцева, О. А. Маракаев

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Ярославль, e-mail: anasanby98@mail.ru

Фосфор – ключевой элемент питания растений. Растения зачастую не способны потреблять почвенный фосфор самостоятельно, так как большая его часть находится в нерастворимой форме. Симбиотические микроорганизмы, в частности, некоторые бактерии рода *Pseudomonas*, высвобождают неорганические формы фосфора, такие как апатиты, в процессе солубилизации. Основным механизмом данного процесса является выделение органических кислот, особенно глюконовой (GA), 2-кетоглюконовой (2-KG), лимонной, щавелевой и других [Farhat, 2009; Raj, 2014]. Гидроксильные и карбоксильные группы этих кислот хелатируют катионы, связанные с фосфатом почвы. Известно, что у многих граммотрицательных бактерий синтез глюконовой кислоты происходит при участии фермента Gcd, и его кофактора пирролохинолинхинона (PQQ) [An, 2016]. 2-кетоглюконовая кислота в свою очередь образуется из глюконовой кислоты с участием фермента глюконатдегидрогеназы (Gad), который кодируется одноименным опероном [del Castillo-Santaella, 2008]. В настоящее время известны праймеры к генам rqq-оперона и гену *gcd* у бактерий разных родов [Alaylar, 2019; Meyer, 2011]. Влияние фермента Gad на процесс фосфатмобилизации в настоящее время изучено слабо, хотя сообщается, что кетоглюконовая кислота эффективнее растворяет минеральные формы фосфора, чем глюконовая. В связи с этим целью данного исследования являлось конструирование системы праймеров, позволяющей амплифицировать участок гена *gad*, и оценка ее эффективности для проведения быстрого скрининга фосфатсолубилизирующих бактерий рода *Pseudomonas*.

В работе использовались штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, выделенные из дерново-подзолистых почв Ярославской области. Штаммы культивировались на агаризованной питательной среде LB при температуре 28°C. Молекулярно-генетическая идентификация штамма осуществлялась методом анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК. ПЦР фрагмента гена 16S рПНК проводилась с использованием универсальных прокариотических праймеров 356F (5'-ACWCCTACGGGWGGCWGC) и 1064R (5'-AYCTCACGRACGAGCTGAC). Идентификация бактериальных штаммов на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности проводилась в базе данных GenBank в программе BLAST. Фосфат-солубилизирующую активность штаммов оценивали с использованием агаризованной среды Пиковской (NH₄Cl – 1,0 г/л, MgSO₄×7H₂O – 0,6 г/л, глюкоза – 10,0 г/л, Ca₃(PO₄)₂ – 6,0 г/л, раствор микроэлементов – 20 мл/л, агар-агар – 20,0 г/л; FeSO₄×7H₂O – 0,01 г/л, CuSO₄×5H₂O – 0,1 г/л, MnSO₄×2H₂O – 0,01 г/л.) на 4 сутки культивирования по диаметру зоны просветления среды вокруг колонии. Для разработки праймеров использовалось программное обеспечение Gene Runner 6.5.50. Подбор референсных последовательностей гена проводился с помощью базы данных GenBank. В качестве референсной использовали последовательность гена *gad* штамма *P. fluorescens* strain CHA0 FJ_694891.1.

Из 37 культивируемых изолятов рода *Pseudomonas*, 28 штаммов дают четкую зону просветления среды вокруг колонии, индексы солубилизации данных штаммов составили от 1,14 до 4. Не проявляли фосфатсолубилизирующей активности 10 штаммов. В аннотированных геномах бактерий рода *Pseudomonas* были изучены последовательности гена *gad*, найдены консервативные участки данного гена и разработаны следующие олигонуклеотидные праймеры: Gad2F: GACATGACCATCCAGGAYTT, Gad2R: CCAGTCGAAGKTCATCCGC. Были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР: предварительная денатурация при 95 °С в течение 4 мин, 30 циклов денатурации при 95 °С в течение 1 мин, отжиг при 58 °С в течение 1 мин, удлинение при 72 °С в течение 90 секунд и окончательное удлинение при 72 °С в течение 5 мин после циклов.

При ПЦР детекции было обнаружено, что из 28 штаммов, обладающих фосфатсолубилизирующей активностью, в 21 штамме был успешно амплифицирован ген *gad*. При этом у 1 из 10 штаммов, не обладающих фосфатсолубилизирующей активностью, данный ген был амплифицирован. Установлено, что эффективность разработан-

ной тест-системы, а именно, вероятность наличия фосфатсолубилизирующих свойств у бактериальных штаммов по присутствию данного гена, составила 81 %. Таким образом, разработанные олигонуклеотидные праймеры позволяют быстро и с высокой вероятностью определять наличие фосфатсолубилизирующих свойств у бактерий рода *Pseudomonas*.

Литература

Alaylar B., Güllüce M., Karadayi M., Isaoglu M. Rapid Detection of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Agricultural Areas in Erzurum // *Current microbiology*. 2019. Vol. 76 (7). P. 804–809.

An R., Moe L. A. Regulation of Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Glucose Dehydrogenase Activity in the Model Rhizosphere-Dwelling Bacterium *Pseudomonas putida* KT2440 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2016. Vol. 82(16). P. 4955–4964.

del Castillo-Santaella, T., Duque E., Ramos J. L. A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *Journal of Bacteriology*. 2008. Vol. 190. P. 2331–2339.

Farhat M. B., Farhat A., Bejar W., Kammoun R., Bouchaala K., Fourati A., Antoun H., Bejar S., Chouayekh H. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CТМ 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa // *Archives of Microbiology*. 2009. Vol. 91. P. 815–824.

Meyer J. B., Frapolli M., Keel C., Maurhofer M. A novel molecular marker for studying phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads: the pyrroloquinoline quinone biosynthetic gene pqqC // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 10. P. 1–35.

Raj D. P., Linda R., Rhema S. B. Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils // *International Journal of Innovative Science, Engineering and Technology*. 2014. Vol. 1. P. 317–324.

ДЕЙСТВИЕ АССОЦИАТИВНЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ (PGPR) НА РАСТЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗЫ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА

Г. А. Воробейков

Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена
Санкт-Петербург, e-mail: gvorobeykov@list.ru

Ростостимулирующие ассоциативные ризобактерии (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR) оказывают многостороннее положительное влияние на растения [Bhattacharyya, Jha, 2012]. Под влиянием PGPR происходят следующие процессы: усиление ассоциативной фиксации молекулярного азота; дополнительное продуцирование физиологически активных соединений, в том числе растительных гормонов, которые увеличивают мощность корневой системы, оптимизируя минеральное питание и улучшая водный режим расте-

ний; участие в растворении труднодоступных фосфорных соединений; выделение антибиотических соединений, защищающих корни от бактериальных и грибных инфекций; подавление стрессовых реакций у растений, повышающих их устойчивость к неблагоприятным внешним факторам [Воробейков и др., 2011; Lebedev et al., 2005].

Исследования по выявлению отзывчивости различных видов и сортов растений на обработку ассоциативными ризобактериями выполняли на Биостанции РГПУ им. А. И. Герцена в течение 28 лет. Работу проводили по единой методике на одних и тех же почвах, с применением одинаковых доз и форм минеральных азотных удобрений, что позволило дать более обоснованные заключения об эффективности того или иного бактериального штамма ризобактерий и выявлении экономического эффекта [Ураев, Лебедев, 2017].

Хотя ассоциативные штаммы не обладают такой узкой специфичностью к видам растений, как клубеньковые бактерии при растительно-бактериальном симбиозе, тем не менее, далеко не каждый интродуцируемый штамм бактерий способен вступать в активную ассоциацию с любым видом и сортом растений [Лебедев, Ураев, 2015]. Известно, что формирование эффективной растительно-бактериальной ассоциации определяется не только количеством выделяемых растением в ризосферное пространство растворимых органических соединений (экссудатов), но и от почвенно-климатических и агротехнических условий, особенно от доз и форм минеральных удобрений. Необходимость внесения удобрений заключается еще в том, что с их помощью устраняется конкуренция растений и ризосферных бактерий за эти элементы питания.

Однако избыточное внесение минерального азота тормозит микробно-растительные взаимодействия. Растения при этом переключаются на питание минеральным азотом. Кроме того, при повышенных дозах минерального азота замедляется развитие растений, повышается удерживающая (аттрагирующая) способность листьев по отношению к другим органам, в результате чего при хорошо развитой листовой поверхности отток ассимилятов из листьев в другие органы, в том числе в корни, затормаживается.

В некоторых работах отмечается несовместимость активных ассоциативных отношений с одновременным использованием высоких доз минерального азота [Лебедев, 2008]. По причине энергетических затрат на использование азота в питании, растению выгоднее потреблять минеральный азот, чем ассоциативный или симбиотический. Подсчитано, что на ассимиляцию одного моля молекулярного азота

(N₂) растению необходимо затратить 730–960 кДж. На восстановление такого же количества азота в виде нитрата (NO₃⁻) до аммония (NH₄⁺) расходуется 300–600 кДж, т. е. затраты на фиксацию атмосферного азота в 1,5–2,5 раза превышают затраты на ассимиляцию нитратов. Поэтому при избыточном внесении минерального азота микроорганизмы и растения переходят на питание минеральными формами азота.

В связи с этим важно знать оптимальную дозу минерального азота, необходимую для успешной инокуляции семян бактериями и для установления активных микробно-растительных взаимодействий. Однако для каждой культуры доза минерального азота должна быть конкретизирована. Так, при оценке взаимодействия сортов ячменя и пшеницы с ризосферными ростстимулирующими бактериями на различном азотном фоне, выявлена их разная реакция на дозы азота [Shrivastava, 2013]. На плодородной почве (гумус 8,6 %) использование ячменем азотных удобрений было неэффективным, тогда как инокуляция ризобактериями была эффективной. Констатируется также, что азотное удобрение, как правило, снижало лишь относительные прибавки от инокуляции (так как увеличивалась продуктивность контрольных растений), однако абсолютные прибавки в целом возрастали.

С другой стороны, инокуляция семян этих культур ассоциативными штаммами бактерий на бедном азотном фоне и без внесения минерального азота не привела к увеличению биомассы исследуемых растений. Дефицит минерального азота в почве, вероятно, усиливает конкуренцию за него как между интродуцируемыми ризобактериями и аборигенной микрофлорой, так и между ризосферными бактериями и растениями. Кроме того, при дефиците азота в растениях затормаживается рост листьев и соответственно – фотосинтез, ослабляется выделение экссудатов в корневую систему, необходимых для жизнедеятельности ризобактерий и для установления эффективных взаимоотношений в растительно-бактериальной ассоциации [Воробейков и др., 2011]. В результате этого растения оказываются более слабыми в конкуренции за азот, что не приводит к значительному повышению их продуктивности.

Работа выполнена в рамках ГРНТИ 34.29.01 ФБГОУ ВО РГПУ им. А. И. Герцена «Изучение и сохранение биологического разнообразия растений».

Литература

Bhattacharyya P. N., Jha D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2012. Vol. 28. P. 1327–1350.

Воробейков Г. А., Кондрат С. В., Лебедев В. Н., Юргина В. С., Муратова Р. Р., Дубенская Г. И., Хмелевская И. А., Выявление эффективности препаратов ассоциативных ризобактерий для различных видов растений // Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий : материалы VII съезда общества физиологов растений. 4–10 июля 2011. Ч. 1. Нижний Новгород : ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2011. С. 151–152.

Lebedev V. N., Vorobeikov G. A., Dmitrieva O. M., Pavlova T. K. Influence of seed's inoculation associative nitrogen-fixation rhizobacteriums on yield and quality of *Sinapis alba* L. // Physiological and molecular-genetic aspects of preservation of a biodiversity: Proceedings International Conference (19–23 September, 2005, Vologda). Vologda : 2005. P. 101.

Ураев Г. А., Лебедев В. Н. Оценка эколого-экономических рисков воздействия на окружающую среду сельскохозяйственных предприятий // Эколого-географические аспекты природопользования, рекреации, туризма : сб. материалов науч.-практ. конф., посвящ. Году экологии в России, 8–9 нояб. 2017 г. Курган, 2017. С. 132–136.

Лебедев В. Н., Ураев Г. А. Оценка эффективности инокуляции семян четырех видов горчиц ассоциативными азотфиксирующими штаммами ризобактерий // Фундаментальные исследования. 2015. № 2-25. С. 5594–5598.

Лебедев В. Н. Минеральное питание, рост и продуктивность горчицы белой (*Sinapis alba* L.) при инокуляции семян ассоциативными ризобактериями : автореф. дис. ... канд. сельхоз. наук. Пушкин, 2008. 18 с.

Shrivastava U. P. Characterization of diazotrophic rhizobacteria under various conditions // International Journal of Applied Sciences and Biotechnology. 2013. Vol. 1, N 3. P. 110–117.

АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ГРИБЫ РОДА EMERICELLOPSIS – ПРОДУЦЕНТЫ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

И. А. Гаврюшина¹, А. Е. Куварина¹, М. Л. Георгиева^{1,2},
Е. А. Рогожин^{1,3}, В. С. Садыкова¹

¹ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе, Москва, e-mail: instna@sovintel.ru

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва
e-mail: info@mail.bio.msu.ru

³ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова, Москва, e-mail: office@ibch.ru

Для успешного роста и жизнедеятельности в экстремальных условиях организмы вырабатывают оригинальные метаболиты, некоторые из которых активно исследуются. Огромное разнообразие биологически активных веществ, обнаруживаемых ежегодно из культивируемых грибов, большой потенциал неизвестных грибных организмов, позволяют считать, что многие продукты, перспективные для медицины, остаются неоткрытыми. Среди представителей грибов из рода *Emericellopsis* известны продуценты биологически активных ве-

ществ [Kuvarina et al., 2021]. Выделение и описание нового алкалофильного вида *Emericellopsis alkalina* [Grum-Grzhimaylo et al., 2013] из содовых солончаков Кулундинской степи (Алтайский край, Россия) стало началом для изучения его антимикробной активности. В 2018 г. из штамма-продуцента *E. alkalina* F1428 был выделен новый антимикробный пептид – эмерициллипсин А (ЭмиА), с противогрибковым действием в отношении патогенных микромицетов [Rogozhin et al., 2018]. В дальнейшем были выявлены еще четыре новых минорных соединения, названные эмерициллипсины В-Е, являющиеся гомологами основного компонента ЭмиА и отличающиеся от него одичными заменами аминокислот [Kuvarina et al., 2021]. Продолжая микологический анализ почвенных образцов на побережье различных засоленных озер Кулундинской степи, было выделено несколько новых изолятов грибов из р. *Emericellopsis*. Цель представляемой работы – изучение их антимикробной активности и количественного содержания ЭмиА.

Материалом для работы были 38 изолятов грибов из р. *Emericellopsis*, выделенные из засоленных биотопов Кулундинской степи. Видовая идентификация проведена на основе морфолого-культурального и молекулярно-генетического изучения. Антимикробную активность изолятов оценивали по разработанной ранее схеме (скрининг методом блоков, анализ экстрактов, оценка количественного содержания на ВЭЖХ). Выращивание культур проводили на щелочной среде [Rogozhin et al., 2018]. Спектр антимикробной активности определяли на тест-культурах из коллекции культур «НИИНА имени Г. Ф. Гаузе»: *Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* FDA 209P и *Escherichia coli* ATCC 25922.

В результате показано, что среди 38 изолятов грибов рода *Emericellopsis* 32 культуры – *E. alkalina*; по 2 культуры – *E. cf. maritima*, *E. cf. terricola* и *Emericellopsis* sp. Антимикробная активность изолятов была высокая при оценке методом блоков по отношению ко всем тест-культурам (*B. subtilis*, *C. albicans* и *A. niger*). После экстракции активность по отношению к *A. niger* сохранилась у всех исследуемых изолятов, однако была значительно ниже, чем у штамма-продуцента *E. alkalina* F1428.

Нами было оценено количественное содержание ЭмиА в культуральной жидкости (КЖ) и мицелии при росте на жидких средах у 32 изолятов вида *E. alkalina*. Показано, что оно значительно варьирует у разных изолятов: у 17 из них количество ЭмиА преобладает в

мицелии. У типового изолята *E. alkalina* E101 максимальное содержание ЭмиА в КЖ и составляет 429,5 мг/л, а максимальное содержание ЭмиА в мицелии отмечено у штамма *E. alkalina* A117 и составило 338,75 мг/л. Штамм-продуцент *E. alkalina* F1428 характеризовался также высокими значениями содержания ЭмиА как в КЖ – 262 мг/л, так и в мицелии – 184 мг/л.

Более подробное изучение биологической активности ЭмиА показало его ингибирующую активность в отношении устойчивых к азолам патогенным штаммам *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. Кроме того, ЭмиА продемонстрировал низкую цитотоксическую активность по отношению к нормальной клеточной линии (HPF), но обладал раковой селективностью к клеточным линиям К-562 и НСТ-116. ЭмиА проявлял незначительную гемолитическую активность в концентрациях 0–20 мкМ, что делает его малотоксичным соединением по отношению к нормальным человеческим клеткам, но с потенциально высоким терапевтическим индексом. Полученные результаты показывают важность дальнейшего изучения этого пептаибола, а также других видов из рода *Emericellopsis* на способность к продукции ЭмиА.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00992 (М. Л. Георгиева, идентификация изолятов) и РНФ 21-75-00062 (А. Е. Куварина, И. А. Гаврюшина выделение и анализ антимикробной активности эмерициллипсинов).

Литература

- Grum-Grzhimaylo A. A., Georgieva M. L., Debets A. J. M., Bilanenko E. N. Are alkalitolerant fungi of the Emericellopsis lineage (Bionectriaceae) of marine origin? // IMA Fungus. 2013. Vol. 4, N 2. P. 211–226.
- Kuvarina A. E., Gavryushina I. A., Kulko A. B., Ivanov I. A., Rogozhin E. A., Georgieva M. L., Sadykova V. S. The Emericellipsins A-E from an alkaliphilic fungus Emericellopsis alkalina show potent activity against multidrug-resistant pathogenic fungi // J. Fungi. 2021. Vol. 7, N 2. P. 153.
- Rogozhin E. A., Sadykova V. S., Baranova A. A., Vasilchenko A. S., Lushpa V. A., Mineev K. S., Georgieva M. L., Kulko A. B., Krashennikov M. E., Lyundup A. V., Vasilchenko A. V., Andreev Ya. A. A novel lipopeptidol Emericellipsin A with antimicrobial and antitumor activity produced by the extremophilic fungus Emericellopsis alkalina // Molecules. 2018. Vol. 23, N 11. P. 2785.

ЛИПОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ РЕКИ ОБЬ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

А. Л. Герасимчук¹, Д. А. Ивасенко²
А. А. Касымова³, Ю. А. Франк⁴

¹ Томский государственный университет, Томск, e-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

² ООО «Дарвин», Томск, e-mail: ivasenko.da@mail.ru

³ Томский государственный университет, Томск, e-mail: fqlyfy2000@mail.ru

⁴ Томский государственный университет, ООО «Дарвин», Томск
e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Бактерии играют важную роль в биогеохимических циклах природных и антропогенных экосистем. В речных экосистемах бактерии, как правило, интенсивно заселяют илистые отложения. Разветвленная структура речной экосистемы собирает бактерии с окружающих земель, включая городские и промышленные районы, очистные сооружения сточных вод и сельскохозяйственные угодья, которые также поставляют растворимые компоненты, такие как органические вещества, питательные вещества или токсичные соединения, в том числе металлы, что в совокупности определяет активность и численность гетеротрофных бактерий в донных отложениях [Fischer et al., 2002]. Поскольку микроорганизмы играют важную роль в преобразовании энергии, биогеохимических циклах питательных веществ, деградации загрязнителей и биотрансформации органических веществ, бактерии часто используются в качестве биоиндикаторов водных экосистем. Кроме того, донные отложения могут являться источником метаболически разнообразных микроорганизмов, в том числе перспективных для промышленных биотехнологий.

Река Обь, протекающая по территории Западной Сибири, занимает одно из первых мест по протяженности, водоносности и площади водосборного бассейна. Из водных бассейнов Сибирского региона для Оби характерна наибольшая антропогенная нагрузка, включая демографическое, сельскохозяйственное и производственное воздействие, и критические показатели качества воды по содержанию некоторых металлов и нефтепродуктов [Koronkevich et al., 2019]. В связи с вышеописанным, большой интерес может представлять анализ структуры и функционирования микробных сообществ водной толщи и донных осадков, в том числе для получения чистых культур биотехнологически перспективных микроорганизмов-деструкторов органического вещества.

Целью данного исследования являлось выделение и изучение чистых культур микроорганизмов-продуцентов промышленно значимых ферментов из донных осадков р. Обь.

Для выделения бактериальных штаммов-продуцентов и деструкторов органических веществ использовали образцы донных осадков среднего течения Оби, отобранных в июле 2020 г. Применяли селективные питательные среды для липофильных и нефтеокисляющих микроорганизмов с добавлением 1 % свиного жира или 1 % нефти, соответственно. Составы сред описаны ранее [Gerasimchuk et al., 2020; Франк и др., 2020]. Филогенетическое положение полученных культур определяли с помощью молекулярных методов, как описано в работе Gerasimchuk et al., 2020. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу данных GenBank под номерами: OM212652, OM212653, OM212656-OM212659, OM212664-OM212671.

Филогенетический анализ показал принадлежность полученных чистых культур к Proteobacteria. Все проанализированные фрагменты ДНК длиной 677-1445 п.о. показали высокий процент сходства (99,8–100 %) с последовательностями микроорганизмов из базы данных GeneBank NCBI. Большинство штаммов оказались представителями *Pseudomonas* и *Aeromonas* класса *Gammaproteobacteria*. Штаммы *Aeromonas* и *Pseudomonas putida* оказались родственны условно патогенным микроорганизмам, относящимся к группе риска II в соответствии с классификацией ВОЗ [<https://bacdiv.dsmz.de/>]. Непатогенные штаммы были близкородственны *Pseudomonas veronii*, *Ps. protegens*, *Ps. brassicacearum*.

Несколько штаммов отнесены к роду *Microvirgula*, класс *Betaproteobacteria*. Представители *Microvirgula* способны к росту в аэробных и анаэробных условиях и имеют нетипичный дыхательный тип метаболизма, используют кислород и оксиды азота в качестве конечных акцепторов электрона [Patureau et al., 1998].

Липолитическая активность для полученных штаммов была подтверждена культивированием на диагностической среде с трибутирином [Ramnath et al., 2017] при температуре +28 °С, +25 °С и +4 °С. Большинство штаммов показали хороший рост на трибутириновом агаре. Однако зоны гидролиза на агаре, свидетельствующие о липолитической активности, образовывали не все штаммы. Так же изучена способность к росту на плотных питательных средах со свиным жиром, оливковым маслом и дизельным топливом.

Наиболее перспективными явились штаммы *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5K3, которые показали не только наличие липолитической активности на трибутириновом агаре в широком диапазоне температур, но и утилизировали такие сложные органические субстраты, как дизельное топливо и свиной жир. Для представителей *M. aerodenitrificans* впервые показана способность к окислению нефтепродуктов и росту на конкретных жиросодержащих субстратах. Ранее сообщалось только о наличии липолитической активности на диагностических средах [Patureau et al., 1998]. Об изучении липолитической активности у *Pseudomonas lini* сведений не обнаружено. Таким образом, нами впервые показана для представителей данного вида липолитическая активность на диагностической среде, а также способность утилизировать нефтепродукты и животный жир.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2020-0019).

Литература

- Fischer H., Wanner S. C., Pusch M. Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM) // *Biogeochemistry*. 2002. Vol. 61. P. 37–55.
- Koronkevich N. I., Barabanova E. A., Georgiadi A. G., Zaitseva I. S., Shaporenko S. I. Anthropogenic Impacts on the Water resources of the Russian Arctic Basin Rivers // *Geography and Natural Resources*. 2019. Vol. 40(1). P. 22–29.
- Gerasimchuk A. L., Ivashenko D. A., Bukhtiyarova P. A., Antsiferov D. V., Frank Y. A. Search for new cultured lipophilic bacteria in industrial fat-containing wastes // *BIO Web Conf. II International Scientific Conference “Plants and Microbes: The Future of Biotechnology” (PLAMIC2020)* Vol. 23. 2020.
- Франк Ю. А., Никитчук К. Л., Сапега А. А., Лукьянова Е. А., Ивашенко Д. А., Косов А. В., Герасимчук А. Л., Евсеева Н. С. Повышение эффективности ремедиации нефтезагрязненных почв в природно-климатических условиях севера Томской области и сопредельных регионов с применением оборигенных микроорганизмов // *Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов*. 2020. Т. 331, № 9. С. 130–139
- Patureau D., Godon J. J., Dabert P., Bouchez T., Bernet N., Delgenes J. P., Moletta R. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions // *J. Syst. Bacteriol*. 1998. Vol. 48, N 3.
- Ramnath L., Sithole B., Govinden R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry // *Biotechnology Reports*. 2017. Vol. 15. P. 114–124.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА УСТОЙЧИВОСТИ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS* К ХЛОРИДУ РТУТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А. А. Гольшева¹, Л. В. Литвиненко², И. Б. Ившина^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет
Пермь, e-mail: nastay133@gmail.com

²Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный
исследовательский центр УрО РАН, Пермь

Чрезмерная негативная деятельность человека в течение последних лет привела к стремительному накоплению отходов, содержащих тяжелые металлы (ТМ), в частности, ртуть. Поступление соединений ртути из антропогенных источников, находящихся вблизи промышленных объектов, ежегодно превышает природные значения до 1,7 раз [Ртутное загрязнение в России, 2016]. Природными источниками являются естественные выветривания ртутьсодержащих горных пород, а также вулканические извержения.

К основным промышленным источникам ртути относятся сжигание угля, сточные воды промышленных предприятий, производство цветных металлов. Интенсивный кругооборот ртути и ее соединений обусловлен стойкостью, природной атомизацией, амальгамацией благородных металлов, способностью пребывать в различных фазовых состояниях, растворимостью в атмосферных осадках, способностью к абсорбции почвой и растениями [Wang et al., 2019]. Восстановление загрязненных ртутью природных сред является сложной задачей с длительным сроком очистки и регенерации. Одной из перспективных групп микроорганизмов для биотехнологических способов ремедиации загрязненных территорий от ртутных загрязнений являются актинобактерии рода *Rhodococcus*. Они обладают рядом технологических преимуществ, среди которых полифункциональность, способность трансформировать органические соединения практически всех известных классов, экологическая пластичность, отсутствие патогенных свойств, а также устойчивость к широкому спектру ионов ТМ. Цель исследования – изучение адаптационного потенциала устойчивости родококков к ионам ртути в зависимости от условий культивирования.

Объект исследования – 114 штаммов *R. ruber* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, www.iegmc01.ru, УНУ_73559). В работе использовали

хлорид ртути (HgCl_2 , ч.д.а.) в концентрации от 0,04 до 80,00 мМ. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) и жидкой минерально-солевой среде (г/л): KH_2PO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002. В качестве единственного источника углерода в минеральной среде использовали *n*-гексадекан (3,0 об.%). Результаты снимали через 2 сут. культивирования при росте в МПБ и 2–5 сут. в жидкой минеральной среде (МС).

В качестве абиотического и биотического контроля использовали питательные среды без внесения ртути. Для определения количественной характеристики резистентности бактериальных клеток к ртути использовали показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК), определяемый микролуночным методом [Ившина и др., 2013].

Для оценки локализации генов, кодирующих признак устойчивости актинобактерий к ТМ, применяли метод горизонтального гелелектрофореза выделения плазмидной ДНК в агарозном геле. Эксперименты проводили при помощи набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия). Для получения и анализа изображений с гелей, окрашенных флуоресцентным красителем GelRed (Biotium, США), использовали гель-документирующую систему GelDoc XR+ (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве контроля – маркер длин ДНК, состоящий из 10 фрагментов в диапазоне от 100 до 1000 п.н. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали традиционными статистическими методами. Поиск возможных генов устойчивости актинобактерий к ТМ проводили в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) по ключевым словам *Actinobacteria*, *Rhodococcus*, heavy metal resistance, heavy metal, mercury, cng, cop, czc, mer, ncc.

По нашим данным, все штаммы родококков проявляли способность к росту в присутствии HgCl_2 . Их устойчивость к ртути варьировала от 0,04 до 2,50 мМ. Обнаружено увеличение (до 30 раз) степени устойчивости родококков к ионам Hg^{2+} при росте бактерий в МПБ, по сравнению с таковой культур, выращенных в МС (рис.). Увеличение времени культивирования (до 5 сут) в МС не показало изменений показателей МИК по сравнению с таковым после 2 сут. эксперимента. У исследованных штаммов плазмиды не обнаружены. В результате проведенного биоинформатического анализа обнаружены наиболее распространенные кодирующие последовательности, обуславливающие устойчивость родококков к Hg^{2+} и отвечающие за синтез таких продуктов, как транспортер катионов двухвалентных металлов, белки

катионной системы эффлюкса CzcD, редуктазы Hg²⁺, белки устойчивости к ТМ ModC, CopC, CopD, а также белки сборки цитохром-С-оксидаз. Наиболее устойчивые бактериальные штаммы были выделены из сточных вод промышленных предприятий или из нефтезагрязненных почв. Отобраны штаммы *R. ruber* ИЭГМ 453, 471, 583 и 1128, проявляющие наибольшую (до 2,50 мМ) устойчивость к Hg²⁺ и перспективные для очистки ртутных загрязнений. Данные микроорганизмы более устойчивы к ртути по сравнению с бактериями-спутниками водорослей *Scenedesmus quadricauda* (0,02 мМ) [Айткельдиева и др., 2007], морскими бактериями *Pseudomonas nautica* (0,05 мМ) [Иваница, Бухтияров, 2004], сульфатредуцирующими бактериями поверхностного слоя льда (0,00037 мМ) [Кондратьева и др., 2018].

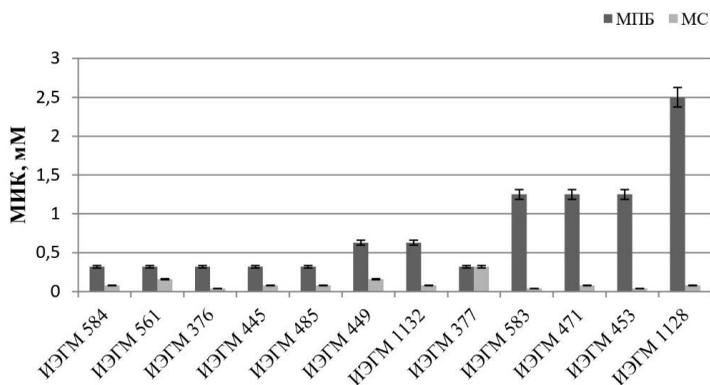


Рис. Устойчивость клеток *R. ruber* к ртути

МПБ – мясопептонный бульон, МС – минеральная среда с *n*-гексадеканом

Работа выполнена в рамках госзаданий АААА-А-19-119112290008-4, ААА-А19-119112290010-7 и гранта РФФИ № 20-44-596001-р_НОЦ_Пермский край с использованием оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Литература

1. Айткельдиева С. А., Салхожаева Г. М., Парамонова И. Е., Шорабаев Е. Ж., Саданов А. К. Роль бактерий-спутников водоросли *Scenedesmus quadricauda* в осаждении ионов ртути // Биотехнология. Теория и практика. 2007. № 4. С. 54–59.

2. Иваница В. А., Бухтияров А. Е. Таксономический состав гетеротрофных бактерий одесского побережья, устойчивых к тяжелым металлам // Морской экологический журнал. 2004. Т. 3, № 3. С. 49–54.

3. Ившина И. Б., Куюкина М. С., Костина Л. В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // Экология. 2013. № 2. С. 115–123.

4. Кондратьева Л. М., Андреева Д. В., Голубева Е. М. Факторы, влияющие на процессы сульфатредукции и метилирования ртути во льдах реки амур // Лед и снег. 2018. Т. 58, № 1. С. 105–116.

5. Ртутное загрязнение в России: проблемы и рекомендации / под ред. А. Романова, О. Сперанской, О. Цитцер. Коломна : Коломенская типография, 2016. 118 с.

6. Wang Z. J., Zhang G., Chen X. B., Zhao Q. J., Wang W. Y., Sheng L. X., Bian H. F., Li Z. X., Wang D. L. Measurement and scaling of mercury on soil and air in a historical artisanal gold mining area in northeastern China // Chinese Geogr. Sci. 2019. Vol. 29. P. 245–257.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛИОТОКСИНА, ПРОДУЦИРУЕМОГО *ASPERGILLUS FUMIGATUS* MX59

Е. В. Гурина, А. С. Васильченко

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-BIO)

Тюменский государственный университет, г. Тюмень

e-mail: e.v.gurina@utmn.ru

Грибы являются хорошо известными продуцентами биоактивных вторичных метаболитов, с разными структурами и антибиотическими свойствами. Одним из таких является аскомицет *Aspergillus fumigatus* MX59, его вторичные метаболиты вызывают интерес у исследователей как потенциальные агенты для борьбы с различными бактериозами и микозами растений.

На сегодняшний день в мире известно несколько коммерческих препаратов на основе глиотоксин-продуцирующих микроорганизмов, такие как SoliCard (США), NTS Nutri-Life TrichoShield (Австралия), Gliogard (США).

Несмотря на то что глиотоксин был открыт более 75 лет назад, его антимикробный потенциал до сих пор малоизучен. Наиболее детальные работы по антибактериальному действию глиотоксина датируются 40-ми годами XX в. [Brian et al., 1945; Johnson et al., 1943; Stanley et al., 1946]. В этой связи представляется актуальным изучение особенностей антибактериального действия глиотоксина – наиболее известного представителя класса эпиполитиодиоксопиперазинов, с использованием современных методов исследования.

Результаты. Глиотоксин выделяли из 6-дневной культуры *A. fumigatus* с помощью экстракции органическими растворителями и разделением с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Принадлежность полученной чистой фракции антибиотика

к глиотоксину определили по результатам масс-спектрометрического анализа изотопного состава и спектров фрагментации.

Установлены минимально-ингибирующие концентрации в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Было обнаружено, что глиотоксин был более эффективен против грамположительных бактерий. Также была оценена динамика бактерицидного эффекта (Time-kill assay) глиотоксина на грамотрицательных и грамположительных бактериях, показавшая отсутствие достоверной связи между типом клеточной стенки и скоростью гибели клеток (от 4 до 24 ч в зависимости от штамма).

Механизм антибактериального действия был изучен нами с использованием генно-инженерных биолюминесцентных репортерных штаммов: *Escherichia coli* K12 MG1655 katG':::lux и *Escherichia coli* K12 MG1655 soxS':::lux. Полученные данные показали, что высокие концентрации глиотоксина подавляют биолюминесценцию, что связано с бактерицидным действием глиотоксина, а более низкие – индуцируют биолюминесцентный отклик, что свидетельствовало об окислительном стрессе. Кроме того, мембранпермеабилизирующий эффект глиотоксина был оценен с использованием эпифлуорисцентной микроскопии, который показал, что глиотоксин вызывает повреждение клеточных мембран бактерий.

Дальнейшие исследования будут посвящены изучению механизма бактерицидного действия глиотоксина на субклеточном уровне и определению субингибиторных эффектов воздействия.

Литература

Brian P. W., Hemming H. G. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride* // Annals of Applied Biology. 1945. Vol. 32, N 3. P. 214–220.

Johnson J. R., Bruce W. F., Dutcher J. D. Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. I. Production, physical and biological properties // Journal of the American Chemical Society. 1943. Vol. 65, N 10. P. 2005–2009.

Stanley N. F., Mills J. A. The biological activity of a substance resembling gliotoxin produced by a strain of *Aspergillus fumigatus* // Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science. 1946. Vol. 24, N 2.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА ИЗ ГНЕЗД ЧЕРНЫХ САДОВЫХ МУРАВЬЕВ

М. В. Демьянкова, Т. А. Ефименко, А. А. Глухова,
О. В. Ефременкова

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе, Москва, e-mail: mary_bunny@mail.ru

В последние годы проблема устойчивости к противомикробным препаратам как патогенов, так и условно-патогенных бактерий, является серьезной во всем мире. Всемирная организация здравоохранения отметила ее как глобальную угрозу. Если существующая тенденция сохранится, то по оценкам к 2050 г. число смертей, вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериями, превысит число смертей, вызванных онкологическими заболеваниями.

Открытие новых противомикробных препаратов становится сложнее с каждым годом, поэтому для их поиска целесообразно выделять микроорганизмы из малоизученных источников, например, донных отложений, мерзлых почв, растений и животных [Butler et al., 2017; Berdy, 2012].

Муравьи широко распространены на всех континентах (кроме Антарктиды), живут в различных условиях с разнообразными пищевыми ресурсами. Только некоторые виды муравьев были изучены на предмет наличия микроорганизмов на их покровах, внутри них или в месте их обитания.

Черный садовый муравей *Lasius niger* – обычный муравей северного полушария и обитает почти во всех ландшафтах, от лесов до больших городов. Размер рабочих муравьев данного вида составляет около 5 мм, тогда как матки могут достигать 16 мм. Гнезда *L. niger* обычно находятся под землей или в песчаных насыпях, но их также можно найти в трещинах стен и гниющей древесине. *L. niger* питается преимущественно падью и другими сахаросодержащими веществами; мелкие беспозвоночные также являются частью их рациона. Известно также, что эти муравьи заселяют жилища людей, вызывая дискомфорт и заметные разрушения [Mueller, 2012; Golichenkov, 2011].

Цель исследования заключалась в оценке разнообразия бактериального сообщества, присутствующего в гнездах черных садовых муравьев (*Lasius niger*), и изучении их антибиотических свойств.

Образцы были отобраны из субстрата муравейников, которые располагались в стволах двух старых яблонь в Московской области.

В исследовании использовались методы поверхностного и глубинного культивирования с использованием сред различного состава, видовой идентификации образцов по морфолого-культуральным признакам и по анализу гена 16S рРНК, определение антибиотической активности методом диффузии в агар, ВЭЖХ и масс-спектрометрия [Гаузе и др., 1983].

В ходе исследования обнаружено, что микробные сообщества двух гнезд черных садовых муравьев в стволах старых яблонь имеют сходный видовой состав: в каждом сообществе присутствуют представители трех видов семейства *Bacillaceae* и один вид актиномицетов из рода *Streptomyces*. Всего было выделено четыре вида бактерий и два вида актиномицетов. Актиномицеты идентифицированы как *Streptomyces antibioticus* и *Streptomyces* sp. Ни одна из бацилл не обладала антибиотической активностью при анализе в отношении широкого круга тест-штаммов, в то время как оба стрептомицета продуцировали антибиотики, которые подавляли рост грамположительных бактерий *in vitro*. Антибиотические вещества, продуцируемые штаммом ИНА 01148, были идентифицированы как актиномицин D и его ближайший гомолог, актиномицин A [Kulkarni et al., 2017]. Мы предположили, что актиномицины изменяют микробное сообщество субстрата муравейника, поскольку они действуют против грамположительных бактерий и грибов. Антибиотическая активность *Streptomyces* sp. ИНА 01156 представляет интерес, поскольку вещества, продуцируемые этим штаммом, подавляют рост устойчивых к медицинским антибиотикам бактерий, включая метициллин-устойчивый штамм *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA) и устойчивый к ванкомицину штамм *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 [Efimenko et al., 2020].

Литература

- Butler M. S., Blaskovich M. A., Cooper M. A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // *J. Antibiot.* 2017. Vol. 70. P. 3–24.
- Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // *J. Antibiot.* 2012. Vol. 65. P. 385–395.
- Mueller U. G. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant-microbe symbiosis // *Curr. Opin. Microbiol.* 2012. Vol. 15. P. 269–277.
- Golichenkov M. V., Novoselov A. L., Marfenina O. E., Dobrovolskaya T. G., Zakalyukina Y. V., Lapygina E. V., Zamolodchikov D. G. Microbiological characteristic of anthills of *Lasius niger* // *Biol. Bull.* 2011. Vol. 38. P. 277–282.
- Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 258 с.
- Kulkarni M., Gorthi S., Banerjee G., Chattopadhyay P. Production, characterization and optimization of actinomycin D from *Streptomyces hydrogenans* IB310 (an antagonistic bacterium against phytopathogens) // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2017. Vol. 10. P. 69–74.

Efimenko T. A., Glukhova A. A., Demiankova M. V., Boykova Y. V., Malkina N. D., Sumarukova I. G., Vasilieva B. F., Rogozhin E. A., Efremenkova O. V., Ivanov I. A., Krassilnikov V. A. Antimicrobial activity of microorganisms isolated from ant nests of *Lasius Niger* // Life. 2020. T. 10, № 6. С. 1–16.

ПОИСК И АНАЛИЗ ЛОКУСОВ И СТРУКТУР CRISPR/CASs СИСТЕМ В ГЕНОМЕ ШТАММА ФИТОПАТОГЕНА *AGROBACTERIUM FABRUM* STR.C58 ПОСРЕДСТВОМ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ

Ю. П. Джиоев¹, А. Ю. Борисенко¹, Л. А. Степаненко¹,
Н. А. Арефьева², Я. А. Портная³, Н. П. Перетолчина¹,
Ю. А. Маркова⁴, Е. И. Стрекаловская⁵, И. Ж. Семинский¹,
В. И. Злобин¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск
e-mail: alanir07@mail.ru

²Иркутский государственный университет, Иркутск

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

⁴Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

⁵Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск

Введение. Сегодня для борьбы с фитопатогенами применяют различные химические пестициды и биологические препараты, но из-за экологической вредности они развивают мультивариантную устойчивость у бактерий, поэтому необходимы новые методы и подходы для борьбы с ними. Одним из прорывных направлений в биологии, сельском хозяйстве и медицине сегодня стали исследования структур CRISPR/Cas систем бактерий. CRISPR/Cas система – это специфическая адаптивная система защиты бактерий и архей от фагов и плазмид. CRISPR-кассеты представляют собой набор коротких палиндромных повторов длиной 21–47 пар нуклеотидов, разделенных уникальными спейсерными сайтами. Спейсеры комплементарно соответствуют участкам генов фагов и плазмид, интерферируемых (вырезанных) и адаптированных в структуры CRISPR-кассет [Bolotin et al., 2005; Makarova et al., 2011]. Рядом с CRISPR-локусом могут находиться cas-гены, продукты которых обеспечивают функционирование CRISPR/Cas систем [Gasiunas et al., 2014]. Для поиска и анализа в геномах локусов и структур CRISPR/Cas систем широко используются методы биоинформатики [Борисенко и др., 2015]. Скрининг спейсеров с помощью этих методов дает возможность в короткие сроки определить степень устойчивости бактерий к специфичным фагам и плазмидам. Исследования в этом направлении крайне актуальны как

для изучения внутривидовых и межвидовых эволюционных процессов, так и для решения практических задач по разработке технологии таргетной фаготерапии инфекционных заболеваний человека и растений [Abedon et al., 2011].

Цель. Посредством программных методов биоинформатики провести поиск и анализ локусов и структур CRISPR/Cas систем в геноме штамма *Agrobacterium fabrum* и определить разнообразие фаговых рас, комплементарно детектируемых через спейсеры CRISPR-кассет.

Материалы и методы. Объектом исследования был геном штамма фитопатогена *Agrobacterium fabrum* str.C58 (входит в *Agrobacterium tumefaciens complex*) из базы данных GenBank (№ NC_003062.2). Для поиска CRISPR/Cas системы использовали методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2). Поиск характеристик cas-генов осуществляли посредством вспомогательных программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0) [Abby et al., 2014]. Для поиска CRISPR-кассет в геноме штамма использовали пять биоинформационных программных алгоритмов поиска: 1) PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats (<http://www.drive5.com/pilercr>), 2) CRISPI: a CRISPR Interactive database (<http://crispi.genouest.org>), 3) CRISPRFinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server>), 4) CRT: CRISPR recognition tool (<http://www.room220.com/crt/>), 5) CRISPRDetect (http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.html). Детекцию фагов через спейсеры выявленных CRISPR-кассет проводили с помощью программ BLASTn по базе данных GenBank-Phage, где были использованы программы: CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html), Mycobacteriophage Database (<http://phagesdb.org/blast>) и Phages database (<http://www.phantome.org/PhageSeed/Phage.cgi>).

Результаты. В результате анализа были выявлены cas-гены: cas3 (класс I) и cas4 (класс I–II) и определены их структурно-функциональные характеристики. На основании программных совпадений по каждому участку в геноме штамма *A. fabrum* str.C58 были обнаружены 2 CRISPR-кассеты. Первая CRISPR-кассета состоит из 3 спейсерных последовательностей размером от 28 до 44 нуклеотидных оснований (н.о.), отделенных 4 повторами длиной 9 н.о. (CCTCCTCCC). Вторая CRISPR-кассета состоит из 2 спейсеров размером от 15 до 27 н.о. и 3 повторов длиной 9 н.о. (TATCGCCAT). Через структуры спейсеров в выявленных CRISPR-кассетах была проведена детекция фаговых рас, с которыми данный штамм встречался за свою эволюционную историю (рис.). Выявленные фаговые расы были

идентифицированы как представители родов бактерий: *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Gordonia*, *Arthrobacter*.

Заключение. Таким образом, используемый в данной работе разработанный биоинформатический программный алгоритм позволяет проводить поиск локусов и описывать структуры CRISPR/Cas-системы бактерий, а также дает возможность оценивать степень их устойчивости к фагам и плазидам. На примере штамма *A. fabrum* str.C58 показано, что, имея в своем геноме 2 локуса CRISPR-кассет и cas-гены, данный штамм высокоустойчив к типам чужеродных фагов. Также количество спейсеров и степень их идентичности протоспейсерам фагов свидетельствует об уровне их воздействия на штамм в ходе эволюции. Поэтому разработка и подбор качественных программных методов и их алгоритмических конструкций позволяют выявлять специфичные особенности исследуемого штамма, которые другими методами могли быть не замечены. Полученная информация, в перспективе позволит подбирать таргетные фаги для проведения таргетной фаготерапии заболеваний растений, вызываемых фитопатогенами.

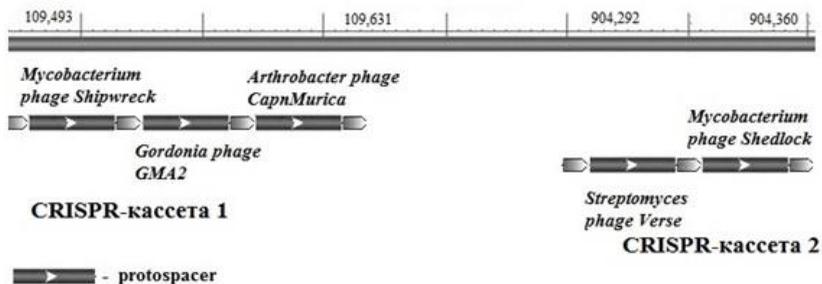


Рис. Расположение структур CRISPR-кассет 1 и 2 соответствующих спейсерам фаговых рас в геноме *Agrobacterium fabrum*

Литература

- Борисенко А. Ю., Джиоев Ю. П., Парамонов А. И. и др. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/Cas систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* // Сибирский медицинский журнал. 2015. № 2. С. 71–74.
- Abby S. S., Néron B., Ménager H., Touchon M., Rocha E. P. C. MacSyFinder: A Program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems / Torres NV, ed. // PLoS ONE. 2014. Vol. 9(10):e110726.
- Abedon S. T., Kuhl S. J., Blasdel B. G., Kutter E. M. Phage treatment of human infections // Bacteriophage. 2011. Vol. 1, N 2. P. 66–85.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // Microbiology. 2005. Vol. 151. P. 2551–2561.

Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity // Cellular and Molecular Life Sciences. 2014. Vol. 71, N 3. P. 449–465.

Makarova K. S., Haft H. D., Barrangou R. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems // Nature Reviews Microbiology. 2011. Vol. 9, N 6. P. 467–477.

ГОМОЛОГ МАКРОЛАКТИНА И ЛИПОПЕПТИДЫ ОПРЕДЕЛЯЮТ ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *BACILLUS VELEZENSIS* X-BIO-1 В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Д. С. Дилбарян, А. С. Васильченко

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-Bio)
Тюменский государственный университет, Тюмень, e-mail: d.d.s98@mail.ru

Бактерии рода *Bacillus* зарекомендовали себя как эффективные агенты биоконтроля болезней культурных растений. Микроорганизмы данного рода характеризуются высокой скоростью размножения, устойчивостью к неблагоприятным условиям среды обитания, а также способностью синтезировать вторичные метаболиты, которые обладают антагонистической активностью в отношении широкого диапазона возбудителей заболеваний культурных растений [Kravchenko et al., 2020]. *Bacillus velezensis* X-BIO-1 является перспективным штаммом для создания биопестицида, поскольку штамм потенциально способен продуцировать спектр антибактериальных и антифунгальных метаболитов различной химической природы [Rabbee et al., 2019].

Цель работы заключалась в определении структурно-функциональных свойств метаболитов *B. velezensis* X-BIO-1, проявляющих антимикробные свойства в отношении фитопатогенных микроорганизмов, и установлении их спектра действия.

Культивирование *B. velezensis* X-BIO-1 с целью наработки вторичных метаболитов осуществлялось в жидкой среде LB. Выделение метаболитов из культуральной жидкости производили методом экстракции органическим растворителем – этилацетатом, в соотношении 1:1. Оставшаяся культуральная жидкость использовалась для преципитации липопептидов.

Особенность антимикробных метаболитов *B. velezensis* X-BIO-1 в том, что проводить их выделение можно практически в одну стадию. Так на препаративном жидкостном флэш-хроматографе низкого давления из этилацетат-экстракта извлекался антибактериальный ан-

тибиотик с чистотой более 75 % (проверено методом ВЭЖХ). А методом преципитации из культуральной жидкости продуцента выделяли липопептиды с чистотой > 80 %.

Анализ с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения показал, что антибактериальный метаболит – это углеводсодержащее вещество с молекулярной массой $[M+Na]^+$ 425,06794. Учитывая, что в геноме *B. velezensis* X-БИО-1 есть кластеры гомологичные кластеру генов, вовлеченных в биосинтез Макролактин А, выделенный метаболит на основании данных масс-спектрометрии и геномного секвенирования, условно отнесен к гомологу макролактин А – макролидного антибиотика из класса макролактинов, насчитывающего более 33 различных молекул [Wu et al., 2021].

Вторая группа метаболитов *B. velezensis* X-БИО-1, получаемая в результате преципитации при 4 °С, является двумя гомологами сурфактина ($[M+H]^+$ 1021,53761, и $[M+H]^+$ 1035,55404) и фенгицина ($[M+H]^+$ 1463,82132).

На следующем этапе мы оценили особенности антибактериального действия гомолога макролактин А. Для этого мы определили количественные и качественные параметры действия антибиотика, используя в качестве сравнения ближайший доступный аналог – азитромицин (макролидный антибиотик). Качественная оценка включала в себя спектр антимикробного действия, а количественная – концентрации и время необходимые для проявления бактерицидного действия.

Так оказалось, что исследуемый антибиотик не проявляет подавляющего действия на грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus* 209 P, *Staphylococcus aureus* ATCC 29923, *Enterococcus faecium* 790SAU, *Bacillus cereus* IP 5832), что отличает его от макролактин А [Kim et al., 2011]. Исследуемый гомолог макролактин А проявляет бактерицидное действие на грамотрицательные микроорганизмы, включая фитопатогенные (*Pectobacterium carotovorum* ВКМ-Б-1247) и патогенный для человека (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753) виды. Не обладает антифунгальным действием.

Используя в качестве модельного объекта *P. carotovorum* ВКМ-Б-1247, мы в тесте Time-kill assay определили время – 4 ч – необходимое для полного подавления жизнеспособности популяции клеток.

Таким образом, *B. velezensis* X-БИО-1 является перспективным штаммом, который может быть использован в качестве продуцента антимикробных соединений. Широкий спектр синтезируемых данным микроорганизмом вторичных метаболитов, в частности малоизученный макролидный антибиотик – макролактин, служит основой

для подтверждения потенциала использования *Bacillus velezensis* X-BIO-1 в качестве биопрепарата в отношении фитопатогенных микроорганизмов. Дальнейшие исследования будут посвящены более детальному исследованию структуры и функционального действия выделенного гомолога макролактина А и разработке биопрепарата для защиты растений на основе метаболитов и микробных клеток *B. velezensis* X-BIO-1.

Литература

Kim D. H., Kim H. K., Kim K. M. et al. Antibacterial Activities of Macrolactin A and 7-O-Succinyl Macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 Against Vancomycin-resistant Enterococci and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Arch Pharm Res. 2011. Vol. 34(1). P. 147–152.

Kravchenko S. V., Poshvina D. V., Vasilchenko A. V., Vasilchenko A. S. Draft genome sequence of the multiple antibiotic producer *Bacillus velezensis* X-BIO-1 // Microbiol Resour Anounc. 2020.

Rabbee M. F., Sarafat A., Jinhee C. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes // Molecules. 2019. P. 1–14.

Wu T., Xiao F., Li W. Macrolactins: biological activity and biosynthesis // Marine Life Science & Technology. 2021. P. 62–68.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *BACILLUS* SPP. ИЗ МЕРЗЛЫХ ПОРОД ДЛЯ УСТОЙЧИВОГО РАСТЕНИЕВОДСТВА В УСЛОВИЯХ ХОЛОДНОГО КЛИМАТА

О. В. Доманская, А. В., Яшников
Д. С. Дилбарян, А. С. Васильченко

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-BIO)
Тюменский государственный университет, Тюмень, e-mail: olga-nv@bk.ru

Биоклиматический потенциал различных северных районов неоднороден и считается менее благоприятным для возделывания различных сельскохозяйственных культур. Во-первых, рост и продуктивность многих хозяйственно важных видов растений чувствительны к температурному режиму, периодическое понижение температуры (0–15 °С) вызывает у растений холодовой стресс. Во-вторых, на развитие устойчивого растениеводства в северных регионах, как и в южных, негативно влияют природно-климатические условия, способствующие развитию фитопатогенов. Результатом действия данных факторов является снижение урожайности. Холодоустойчивые и

психрофильные микроорганизмы, продуцирующие фитостимуляторы и антимикробные вторичные метаболиты, являются конкурентоспособной альтернативой химическим препаратам.

Бактерии рода *Bacillus* являются спорообразующими микроорганизмами, способными расти в широком температурном диапазоне, различных уровнях УФ-излучения, а также при дефиците питательных веществ.

В связи с вышеизложенным, цель работы заключалась в исследовании способности штаммов рода *Bacillus*, выделенных из многолетнемерзлых пород Западной Сибири к мобилизации фосфатов *in vitro* и продукции фитогормонов, таких как ауксин и гиббереллин.

В работе изучали бактериальные штаммы рода *Bacillus*, выделенные из многолетнемерзлых пород, которые были отобраны на территории Западной Сибири (ЯНАО) в окрестностях г. Тарко-Сале. Видовая идентификация этих штаммов проводилась методом секвенирования по 16S rRNA и депонирована в НИЦ "Курчатовский институт" – ГосНИИГенетика. Способность штаммов к мобилизации неорганических фосфатов оценивали при культивировании в жидкой среде NBRIP. Содержание подвижных форм фосфора в супернатанте определяли по методу А. Т. Кирсанова. Содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной суспензии определяли с помощью реактива Сальковского. Концентрацию гиббереллиновой кислоты в супернатанте определяли спектрометрическим методом. Полученные результаты были статистически обработаны с использованием программного обеспечения Origin 2021 (OriginLab Corporation, , США).

По результатам секвенирования штаммы идентифицированы как *B. simplex* 948 P1, *B. cereus* 875, *B. megaterium* 312.

Оценка способности мерзлотных штаммов мобилизовать фосфаты железа на жидкой среде NBRIP показала, что все штаммы обладали фосфатмобилизирующей активностью. Наибольшая активность отмечена у штамма *B. simplex* 948 P1 при температуре 15°C (1,65±0,01 мкг/мл) и при 27°C (1,93±0,00 мкг/мл). Все изученные штаммы *Bacillus spp.*, были способны продуцировать ИУК в широком диапазоне температур культивирования. Однако наибольший количественный выход фитогормона (95,2 мкг/мл) наблюдался при культивировании *B. simplex* 948 P1 (95,2±10,8 мкг/мл) 22 °C. Оптимальный синтез гиббереллина зависел от условий культивирования. Самая высокая концентрация гиббереллиновой кислоты отмечена на 5 сутки инкубации при 27°C для штамма *B. cereus* 875 (18,88±0,02 мкг/мл) и при 15°C у *B. simplex* 948 P1 (9,72±0,01).

Полученные в нашем исследовании результаты подтвердили способность изученных штаммов *Bacillus* к росту и синтезу фитогормонов, а также мобилизации фосфатов из труднорастворимых неорганических форм в условиях, характерных для северных территорий. Таким образом, бактериальные штаммы рода *Bacillus*, выделенные из многолетнемерзлых пород, являются перспективными и конкурентоспособными объектами, и их можно рассматривать как потенциальные источники для создания биопрепаратов для сельского хозяйства в условиях северных территорий.

НОВАЯ L-АСПАРАГИНАЗА ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS*

М. В. Думина¹, А. А. Жгун¹, М. В. Покровская², С. С. Александрова²,
Д. Д. Жданов², Н. Н. Соколов², М. А. Эльдаров

¹ФИЦ биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К. Г. Скрябина
Москва, e-mail: office@biengi.ac.ru

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В. Н. Ореховича, Москва, e-mail: inst@ibmc.msk.ru

Thermococcus – филогенетически обособленная и самая многочисленная группа термофильных/ гипертермофильных архей с широким диапазоном температур роста, 55–95 °С. С биотехнологической точки зрения это одна из самых перспективных групп экстремофильных микроорганизмов.

Для представителей рода *Thermococcus* в настоящее время описаны термостабильные ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы, алкогольдегидрогеназы, пролидаза, бета-глюкозидаза, бета-D-глюкозамидаза и ряд других ферментов.

В нашем исследовании у выделенной из нефтяного месторождения Самотлор при температуре 84°C гипертермофильной анаэробной археи *Thermococcus sibiricus* [Miroshnichenko et al., 2001] был обнаружен биотехнологически важный фермент – L-аспарагиназа (L-АСП).

L-АСП на протяжении многих лет эффективно применяются в онкогематологии, в высокотемпературных процессах в пищевой промышленности для предотвращения образования потенциального канцерогена – ациламида, а также при создании биосенсоров [Dumina et al., 2020].

Анализ аминокислотной последовательности L-АСП *T. sibiricus* (TsA) выявил гомологию с L-АСП других гипертермофильных архей *Thermococcus* sp. и *Pyrococcus* sp.: *Thermococcus litoralis* – 77 %, *Thermococcus zilligii* – 62 %, *Thermococcus gammatolerans* – 61%,

Thermococcus kodakarensis – 63 %, *Pyrococcus yayanosii* – 62 %, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* – 56%. Уровень гомологии TsA с L-АСП nearхейного происхождения не превышал 33%.

Высокую экспрессию функционально активной формы белка в клетках *Escherichia coli* удалось получить после оптимизации по коновому составу нуклеотидной последовательности L-АСП *T. sibiricus* (*tsA_mod*). Экспрессию проводили с использованием вектора pET-28a(+) под контролем промотора гена 10 фага T7.

Стадии выделения и очистки TsA из клеток штамма-продуцента методом ионообменной хроматографии позволили получить белок со степенью очистки 4.1. По результатам ДНС-ПААГ молекулярная масса белка составила 37.5 кДа.

Анализ субстратной специфичности TsA выявил высокую активность при гидролизе L-аспарагина – 2164,0 МЕ/мг, а также незначительную способность к гидролизу L-глутамина, не превышающую 7 % от таковой для L-аспарагина.

Кинетические константы для TsA составили: V_{\max} 1200 мкМ/мин, K_M 2,8 мМ.

L-АСП *T. sibiricus* при оптимуме 90 °С и pH 9.0 сохраняла высокую активность в широком диапазоне как температуры, так и pH независимо от буферной системы (рис.). TsA проявляла термостабильность, устойчивость к химической денатурации в присутствии мочевины до концентрации 6М, устойчивость к присутствию в среде ионов металлов (рис.).

В экспериментах по изучению цитотоксичности *in vitro* было установлено, что TsA проявляет цитотоксическую активность в отношении линий опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, карциномы легкого A549, миелоидной лейкемии человека K562. При этом фибробласты человека WI-38 были практически нечувствительны к обработке TsA вплоть до высоких концентраций ~100 МЕ/мл.

Согласно полученным экспериментальным данным, ранее неохарактеризованная L-АСП из гипертермофильной археи *T. sibiricus* является перспективной для дальнейшего изучения и имеет перспективы применения как в биомедицине, так и пищевой промышленности.

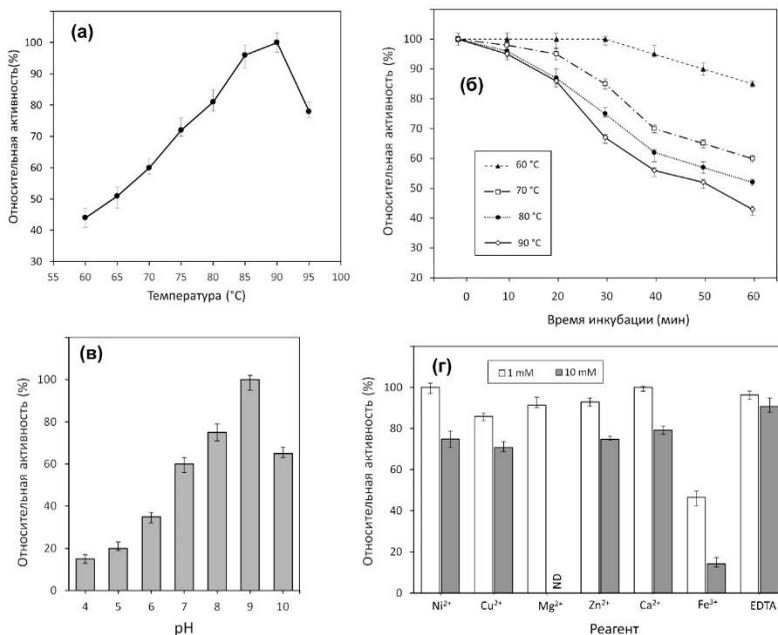


Рис. Влияние температуры на (а) активность и (б) стабильность TsA. Стабильность выражена как остаточная активность (%) при инкубации длительностью 0-60 мин. Влияние (в) pH и (г) ионов металлов на каталитическую активность TsA, где ND – неопределенное значение

Литература.

- Dumina M. V., Eldarov M. A., Zdanov D. D., Sokolov N. N. L-Asparaginases of Extremophilic Microorganisms in Biomedicine // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2020. Vol. 14, N 4.
- Miroshnichenko M. L., Hippe H., Stackebrandt E., Kostrikina N. A., Chernyh N. A., Jeanthon C., Nazina T. N., Belyaev S. S., Bonch-Osmolovskaya E. A. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir // Extremophiles. 2001. Vol. 5, N 2.

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТРОПИЧЕСКИМИ МНОГОНОЖКАМИ (ВЬЕТНАМ)

Т. А. Ефименко¹, А. В. Якушев², А. А. Карабанова¹, А. А. Глухова¹,
М. В. Демьянкова¹, Б. Ф. Васильева¹, О. В. Ефременкова¹

¹Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе, Москва, e-mail: efimen@inbox.ru

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

Глобальной проблемой современного здравоохранения является антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов. Таким образом, изыскание продуцентов антибиотиков, преодолевающих множественную лекарственную устойчивость, и создание антимикробных препаратов на их основе являются одной из мер комплексного решения борьбы с инфекционными заболеваниями.

Целью исследования являлось изучение бактерий, выделенных из кишечного тракта тропических многоножек и их кормового субстрата, и выявление среди них штаммов – продуцентов антибиотиков, обладающих активностью в отношении мультирезистентных форм патогенных микроорганизмов.

В общей сложности из кишечного тракта диплопод *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp. и их кормового субстрата (гнилой древесины и листового опада, соответственно) выделены 55 штаммов антиобактерий, определена видовая принадлежность на основании анализа гена 16S рРНК, и изучена антимикробная активность в отношении 11 тест-штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов. Выявлена высокая доля антибиотически активных штаммов: из *Nedyopus dawydoffiae* – 81 % (13 из 16 штаммов); гнилой древесины – 100 % (12 из 12 штаммов); *Orthomorpha* sp. – 83 % (5 из 6 штаммов); листового опада – 90% (19 из 21 штамма). При этом обнаружено, что 40 штаммов – продуцентов антибиотиков, обладали активностью в отношении грибов *Aspergillus niger* INA 00760 и *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, 47 штаммов – в отношении грамположительных и 7 штаммов – в отношении грамотрицательных тест-штаммов бактерий. Среди них 29 штаммов проявляли активность в отношении метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), 38 – в отношении *Leuconostoc mesenteroides* (vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* – VRLM), обладающего природной устойчивостью к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина, и 2 – в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью.

Видовая идентификация отобранных актинобактерий – продуцентов антибиотиков на основании анализа последовательности гена 16S рРНК показала принадлежность к роду *Streptomyces*, а также к редким родам *Kitasatospora*, *Lechevalieria*, *Nocardioopsis*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*.

Богатое видовое разнообразие бактерий, выделенных из кишечника тропических многоножек и их кормовых субстратов, в том числе обнаружение представителей редких родов актинобактерий, а также высокая доля антибиотически активных штаммов, показывают перспективность данной экологической группы в дальнейшем исследовании и изыскании штаммов – продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость патогенных микроорганизмов.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММА *BACILLUS VELEZENSIS* ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ РУБЦА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

Л. А. Ильина¹, Е. С. Пономарева²

¹ООО «БИОТРОФ+», Санкт-Петербург
e-mail: ilina@biotrof.ru, kate@biotrof.ru

Целью исследования был молекулярно-биологический анализ и биоинформатическая аннотация генома штамма бактерии *Bacillus velezensis*, выделенный из рубца северного оленя Ненецкой породы. Выделение ДНК проводили по стандартным методикам с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Библиотеку ДНК для полногеномного секвенирования готовили с помощью набора Nextera XT (Illumina, Inc., США). Нуклеотидные последовательности определяли с использованием прибора MiSeq (Illumina, Inc., США).

Сообщалось, что многочисленные штаммы этого вида подавляют рост микробных патогенов, включая бактерии, грибы и нематоды. Геномный анализ показал, что *B. velezensis* обладает штамм-специфическими кластерами генов, связанными с биосинтезом вторичных метаболитов, которые играют важную роль как в подавлении патогенов, так и в стимулировании роста растений. Вторичные метаболиты, продуцируемые *B. velezensis*, также могут вызывать индуцированную системную резистентность у растений – процесс, с помощью которого растения защищаются от повторяющихся атак вирулентных микроорганизмов. [Ongena, 2008]

Функциональную аннотацию генома проводили на сервисе RAST 2.0 (<https://rast.nmpdr.org>), в результате было установлено, что штамм обладал продуктами для функционирования полного набора метаболических путей, включая гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и пентозофосфатный путь.

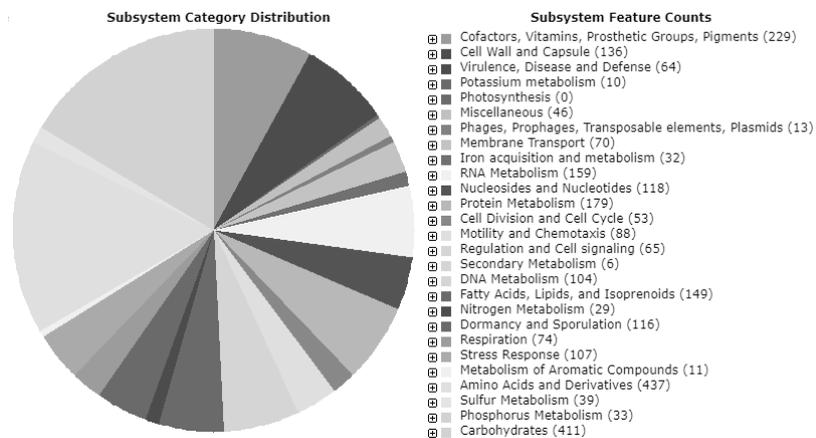


Рис. 1. Метаболические системы штамма *Bacillus velezensis* на основе результатов функциональной аннотации согласно базе данных RAST (<https://rast.nmpdr.org>)

После этого сборку генома загрузили для анализа в базу данных KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), используя программу KEGG Automatic Annotation Server и алгоритм GHOSTX, bi-directional best hit (BBH). Которая работает базе данных SEED (платформа для поддержки сравнительного анализа и аннотации геномов).

В геноме были выявлены пути синтеза различных аминокислот, большинства витаминов группы В (тиамина, рибофлавина, никотиамида, витамина В5).

У штамма обнаружен полный путь синтеза дипептидного антибиотика бацилизина (рис. 2). Бацилизин – нерибосомно синтезируемый антимикробный дипептид, который был обнаружен у одного из штаммов рода *B. subtilis* еще в 1946 г. как вещество, вызывающее частичный лизис растущих культур *Staphylococcus aureus* [Abraham, 1946]. Несмотря на свою простую структуру, он активен против широкого спектра бактерий и грибов в том числе *Candida albicans* [Kenig, 1976]. Кроме этого, штамм способен синтезировать бета-лактамазу класса А.

Прямоугольниками обозначены белки, кодируемые генами, цифрами в прямоугольниках обозначены коды ферментов в номенклатуре IUPAC, кружками обозначены различные химические соединения, стрелками показано молекулярное взаимодействие между веществами (непрерывистые стрелки означают прямое взаимодействие, прерывистые стрелки – косвенное взаимодействие).

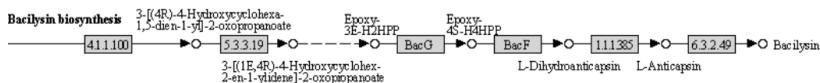


Рис. 2. Метаболический путь, приводящий к образованию бацилизина, у исследованного штамма

Помимо бацилизина были также обнаружены участки генов, кодирующие и другие бактериостатические антибиотики (амилоциклин, бациллин, бациллибактин, бацилломицин D, дифицидин, макролактин и сурфактин).

Используя полученные в ходе биоинформатической обработки данные, мы можем судить о потенциале применения исследуемого штамма в качестве биопрепарата или пробиотика. Биологические препараты часто используются для защиты от патогенов, так как их применение безопасно для окружающей среды. Помимо снижения химической нагрузки на агроэкосистемы, такие вещества недорого стоят, могут чередоваться с химическими средствами и высоко эффективны. Применение биопрепаратов также положительно влияет на урожайность, качество продуктов, их пищевую и кормовую ценность.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 17-76-20026 «Микробиоценоз рубца Rangifer tarandus Арктических регионов России как фундаментальная основа получения перспективных биотехнологий для сельскохозяйственных животных».

Литература

- Abraham E. P., Callow D., Gilliver K. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to growth in the presence of certain antibiotics // Nature. 1946. Vol. 158 (4023). P. 818–821. <https://doi.org/10.1038/158818a0>
- Kenig M., Abraham E. P. Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin // Journal of general microbiology. 1976. Vol. 94, N 1. P. 37–45. <https://doi.org/10.1099/00221287-94-1-37>
- Ongena M., Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol // Trends Microbiol. 2008. Vol. 16. P. 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

О ВНЕДРЕНИИ ТЕХНОЛОГИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ

А. Е. Калинович, С. А. Татарников, А. В. Уланская

ООО «Гидротехнологии Сибири», Иркутск
e-mail: kalinovichae@nefteshlamov.net

Общество с ограниченной ответственностью «Гидротехнологии Сибири» специализируется на утилизации нефтезагрязненных грунтов, образовавшихся в результате техногенных аварий, повлекших за собой загрязнение окружающей среды нефтью или нефтепродуктами. Свою деятельность предприятие ведет с применением современных микробиологических методов ремедиации, что позволяет вернуть грунт обратно в природу после очистки, это выгодно отличает природоподобные технологии от физических и химических методов утилизации нефтяных загрязнений.

Используемые технологии являются компиляцией из исследований, проведенных отечественными и зарубежными авторами в последние 20 лет, они постоянно модифицируются с целью повышения технологичности, эффективности и безопасности для окружающей среды, а также с целью уменьшения себестоимости, логистической зависимости и иных негативных факторов. Таким образом, микробиологическое научное подразделение организации проводит работу в трех основных направлениях:

1. Тесное сотрудничество с научными учреждениями России и мира, целью которого является методологическое и технологическое развитие отрасли. Создание сообщества, нацеленного прежде всего не на получение быстрой прибыли, но на развитие отрасли и рынка природоподобных технологий в России.

2. Адаптация научных знаний к условиям практического применения. Превращение потенциально полезных знаний в действительную технологию.

3. Пропаганда применения природоподобных технологий в бизнесе и природопользовании. Просветительская деятельность в этой сфере.

В настоящее время ООО «ГТС» ведет работу по утилизации нефтешламов по заказу ООО «ИНК» на Ярактинском и Ичёдинском нефтяных месторождениях, где располагаются площадки биоремедиации. Утилизация ведется площадным методом с использованием микроорганизмов р. *Rhodococcus* из коллекции ИЭГМ УрО РАН, однако с 2019 г. ведется работа по адаптации микроорганизмов

р. *Psychrobacter* и р. *Bacillus* из коллекции ТОИ ДВО РАН, являющихся факультативными анаэробами, к условиям промышленного масштабирования и использования в качестве утилизаторов глубоких загрязнений грунта.

Важно понимать, что методы микробиологической ремедиации не позволяют быстро произвести глубокую очистку грунта до состояния, когда его можно безопасно вернуть в природу, однако снижение концентрации нефтепродуктов наблюдается стабильное, уже в первый год проведения работ можно наблюдать значительные изменения. На рисунке приведена динамика изменения концентрации нефтепродуктов в грунте с течением времени при проведении работ по биоремедиации на Ярактинском нефтегазоконденсатном месторождении за 2021 г.

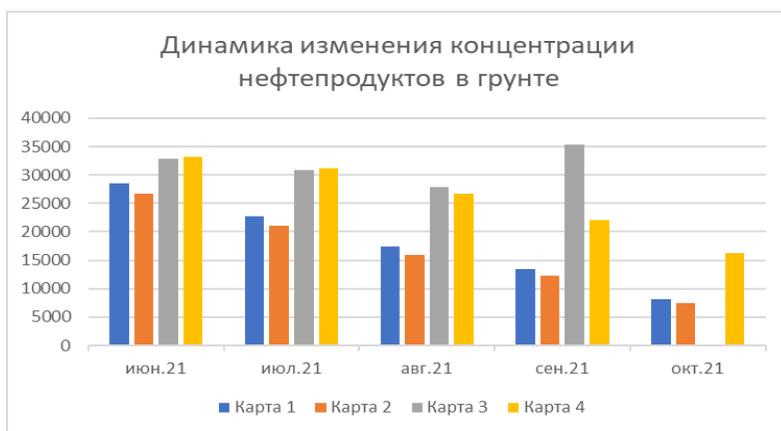


Рис. Динамика изменения концентрации нефтепродуктов в грунте под воздействием микроорганизмов с течением времени

Как мы можем видеть, на всех картах, кроме № 3, где была допущена ошибка размещения грунтов, наблюдается устойчивое снижение концентрации загрязнителя.

Технические условия позволяют вернуть грунт в хозяйственную деятельность, допускают концентрацию в нем нефтепродуктов 33 000 мг/кг, однако ООО «ГТС» стремится снизить концентрацию загрязнителя, насколько это возможно за теплый период, чтобы достичь максимальной пользы для экосистемы. Естественно, такой грунт используется в качестве технического, но запущенные на площадках биоремедиации процессы продолжают в нем еще несколько

лет, и со временем он очищается достаточно для того, чтобы вернуть его обратно в природу.

С 2021 г. проводится работа над технологией биоремедиации нефтезагрязненных грунтов в условиях крайнего севера с использованием психроактивных алканотрофных микроорганизмов *R. qingshengii* ИЭГМ 1359 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 639 в составе консорциума. Работа проводится в г. Норильск, где развернут цех по производству нативного биопрепарата.

За время работы микробиологическое научное подразделение ООО «ГТС» продвинулось в адаптации почерпнутых в научных публикациях разработок к реальному использованию. Так, например, цикл наработки биопрепарата на основе бактерий р. *Rhodococcus* был сокращен с 24 ч до 12 без потери работоспособности конечного продукта. Разработаны мобильные цеха наработки биопрепарата, которые можно развернуть непосредственно на месте проведения работ по биоремедиации, что снизило себестоимость и убрало потребность в излишней логистической нагрузке.

Попутно разработана технологическая схема такого развертывания, которая сделала возможным сократить срок подготовительных мероприятий. В данный момент ведется работа по выпуску собственного биопрепарата как товарного продукта.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СРЕДСТВА ИЗ ШТАММОВ НЕМАТОФАГОВЫХ ГРИБОВ *ARTHROBOTRYS OLIGOSPORA* ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В УСЛОВИЯХ ЯКУТИИ

Л. М. Кокколова, Л. Ю. Гаврильева, С. М. Степанова

Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства

им. М. Г. Сафронова, Якутск

e-mail: kokolova_lm@mail.ru, lubov.gavrileva86@mail.ru

Цель работы: выделить из мерзлотных почв Якутии хищные нематофаговые грибы *Arthrobotrys oligospora*, изучить их нематофаговую активность и разработать методику получения биологически активного средства на основе мицелиальной массы штаммов L₃-1 и L₃-2 а *Arthrobotrys oligospora*.

В настоящее время обнаружено около 160 видов микроскопических грибов, агрессивных по отношению к нематодам и их личинкам. Их назвали хищными грибами, грибами нематофагами или грибами-

гифомицетами. Нематофаговые грибы–гифомицеты найдены практически во всех частях света и в разных климатических зонах [Gray, 1987; Fritsch and Lysek, 1989; Waller, 1993].

В мировой практике одним из наиболее распространенных и часто встречаемых в почве, фекалиях животных, и обладающими значительными хищническими способностями считается нематофаговый гриб рода *Arthrobotrys oligospora*. Этот микроскопический гриб, превосходный охотник на нематод и их личинок, обитает в почве, пресной и соленой воде, питается продуктами гниения. Вероятно, поэтому многими исследователями хищные грибы выделяются из образцов почвы, фекалий, из остатков кормов, трухи и др., т. е. везде, где только могут существовать нематоды [Теплякова, 1999].

Из мерзлотной почвы Якутии нами выделены нематофаговые грибы, которые по морфологическим и физиологическим характеристикам были определены как *Arthrobotrys oligospora*. Из этих микроскопических грибов были выделены два штамма *Arthrobotrys oligospora*. *L3-1* и *Arthrobotrys oligospora*. *L3-2*. На питательных средах Чапека для грибов штаммы *Arthrobotrys oligospora* *L3-1* и *L3-2* показали быстрый рост, плотное развитие мицелиальной массы. Поднимающийся над субстратом свои воздушные колонии мицелий хорошо развит, гифы обладают способностью образовывать специальные ловчие приспособления в виде колец и петель или более сложное сплетение, способные захватить и уничтожить нематод и их личинок.

Изучение биологической активности штаммов *Arthrobotrys oligospora* против личинок стронгилят лошадей в экспериментальных опытах показали их высокую нематофаговую активность. Определена высокая степень хищничества штаммов *Arthrobotrys oligospora* *L3-1* и *L3-2* в отношении личинок стронгилят лошадей. Наблюдали быстрый рост макроконидий и образование ловчих петель (150–180 колец в поле зрения микроскопа) на питательной среде при наличии личинок стронгилят ($n = 25 \dots 100$).

Разработана методика получения биологически активного средства из мицелиальной массы штаммов *Arthrobotrys oligospora* *L3-1* и *L3-2* сухой и жидкой формы. Нематофаговая активность оценивалась в естественных условиях на пастбищах и участках коневодческих базах Центральной Якутии. Результаты применения биологически активного средства из мицелиальной массы штаммов *Arthrobotrys oligospora* сухой и жидкой формы показали, что нематофаговые грибы в почве могут сохранять свою нематофаговую активность и развиваться в естественных условиях. На конепастбищах результаты

экспериментов показали, что при наличии нематофаговых грибов значительно затормаживается процесс освоения личинками нематод окружающего пространства, а нематофаговые грибы при наличии личинок стронгилят увеличивают свой репродукционный потенциал для их уничтожения.

Таким образом, из мерзлотных почв Якутии выделены два штамма хищных грибов *Arthrobotrys oligospora* L₃-1 и L₃-2, изучена их нематофаговая активность против стронгилят лошадей и их личинок, разработана методика получения биологически активного средства из мицелиальной массы грибов *Arthrobotrys oligospora* L₃-1 и L₃-2. Биологически активное средство можно применить для обеззараживания окружающей среды от нематод и их личинок.

Литература

- Grey N. F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology // Boil. Rev. 1987. Vol. 62. P. 245–304
- Fritsch A., Lysek G. Nematode capturing Hyphomycetes from soil over Xerophytic Calcareous Rock in Upper Bavaria // Botanica Acta. 1989. Vol. 102. P. 270–275.
- Waller P. J. Towards sustainable nematode parasite control of livestock // Veterinary Parasitology. 1993. Vol. 48. P. 295–309.
- Теплякова Т. В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов. Новосибирск, 1999. 252 с.

ФОРМИРОВАНИЕ МОНОСЛОЕВ ЛЕНГМЮРА ИЗ НАТИВНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БАКТЕРИЙ *E. coli* K-12

В. А. Кузнецова, К. В. Зубова, М. В. Каневский
Е. В. Глинская, Е. Г. Глуховской

Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, e-mail: viktoriaakuznecova807@gmail.com

Клеточная мембрана является одной из структур, участвующих в адаптации микроорганизмов. В частности, она состоит из фосфолипидов, которые за счет своей амфифильной природы образуют двойной слой. Данный слой в мембране является компонентом, участвующим в процессе приспособления микроорганизмов к факторам внешней среды [Шипко, 2019].

Целью настоящей работы являлось построение и характеристика монослоев Ленгмюра из нативных фосфолипидов, выделенных из бактерий *E. coli* K-12.

Для формирования монослоя использовали нативные фосфолипиды, выделенные из стандартной тест-культуры *E. coli* K-12 (ГИСК имени Л. А. Тарасевича, Москва). Определение состава и соотношения жирных кислот липида А осуществляли методом ГЖХ метиловых эфиров ЖК (МЭЖК). Метилирование жирных кислот липида А выполняли согласно методике, описанной в работе [Mayer et al., 1985].

Результаты показали, что в составе липида А бактерий *E. coli* K-12 обнаружены шесть метиловых эфиров жирных кислот: метил гексадеcanoат, метил транс-9-октадеcanoат, метил цис-9-гексадеcanoат, метил цис-9,10-метиленгексадеcanoат, метил октадеcanoат и метил тетрадеcanoат. Более 60 % от общего объема всех эфиров жирных кислот составляет метил гексадеcanoат [Зубова, 2021].

Для формирования монослоя готовили рабочий раствор нативных фосфолипидов в хлороформе с концентрацией $C = 10^{-4}$ М. Для исследования формирования монослоя при разных значениях температур (30, 33, 37, 41, 44 °С) раствор вносили на поверхность воды в количестве $V = 100$ мкл.

На зависимости давления и модуля сжатия от удельной площади можно видеть 3–4 участка, которые соответствуют состояниям молекулы с плотной упаковкой (рис., табл.).

На рисунке видно, что самое плотное третье (на изотерме слева направо) из плотноупакованных состояний формируется при минимальных значениях удельных площадей $A = 1,7-1,9$ нм², для которых модуль сжатия максимален $C-1 = 0,639$ мН/м, а рассчитанное A_0 в этом состоянии имеет величину около 2,065 при очень низких давлениях порядка 2-5 мН/м и при сжатии до величины удельной площади порядка 1,5–1,9 нм². Для данной бактерии плотное состояние монослоя при температуре 37 °С является нормой. Так как среда обитания *E. coli* K-12 является организм человека, средняя температура которого 37 °С. Полученные значения для этого состояния имеют величины модуля сжатия меньше, чем для типичных фосфолипидов (дипальмитоил фосфатидилхолина) или классических ПАВ, например, из ряда жирных кислот (стеариновой, арахидиновой, олеиновой). Кроме того, по приведенным зависимостям видно, что существуют как минимум еще три состояния, в которых молекулы монослоя упаковываются в плотные структуры. На этих участках модуль сжатия имеет локальные максимумы, свидетельствующие о повышении механической прочности монослоя и его высокой стабильности.

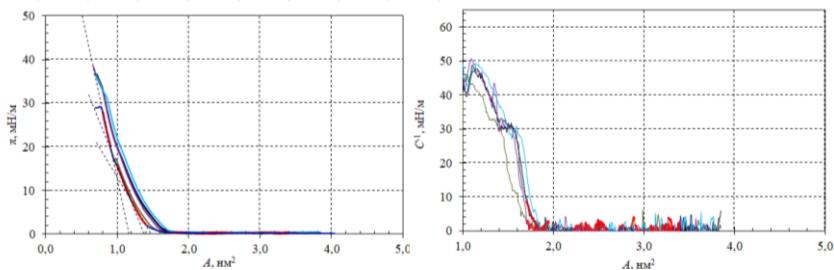


Рис. Изотермы (слева) и модуль сжатия монослоев (справа) (зеленый – 30 °С, синий – 33 °С, черный – 37 °С, фиолетовый – 41 °С, голубой – 44 °С)

Таблица

Параметры монослоев нативных фосфолипидов

Параметры	30	33	37	41	44
$A_{min} =$	2,1	2,3	1,7	1,7	1,85
$A_{max} =$	2,38	2,6	1,9	1,9	1,95
$a =$	0,06	0,17	1,32	0,37	0,36
$b =$	0,23	0,74	2,73	0,98	1,07
$A_0 =$	3,594	4,380	2,065	2,68	2,945
$C_0 = K_0 =$	56,1523	25,996	1,5636	7,3144	8,113
$C_0^{-1} = \chi =$	0,0178	0,038	0,639	0,136	0,123

Монослои Ленгмюра, состоящие из нативных фосфолипидов, выделенных из бактерий *E. coli* K-12, являются моделью клеточной мембраны. На основе монослоев можно наблюдать за различными изменениями состояния мембраны под действием факторов внешней среды.

Литература

- Зубова К. В., Кузнецова В. А., Аль-Альвани А. Ж., Глинская Е. В., Каневский М. В., Глуховской Е. Г. Исследования ленгмюровских монослоев фосфолипидов, выделенных из мембран тест-культуры *E. coli* K-12 // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ. 2021. Т. 6, № 2. С. 68–69.
- Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria // Meth. microbiol. 1985. Vol. 18. P. 157–207.
- Шипко Е. С., Дуванова О. В. Изменение спектра жирных кислот как один из механизмов адаптации / персистенции микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019. № 5. С. 109–118.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АССОЦИАТИВНЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ НА КАПУСТНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПРИ НОРМАЛЬНОМ УВЛАЖНЕНИИ И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ

В. Н. Лебедев

Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена
Санкт-Петербург, e-mail: antares-80@yandex.ru

Современная адаптивно-ландшафтная система земледелия предполагает тщательный подбор штаммов ассоциативных ризобактерий [Тихонович и др., 2015]. Подобранные штаммы должны не только обладать комплементарными свойствами в отношении корневых экссудатов, которые выделяют корневые системы [Воробейков и др., 2005; Шапошников и др., 2011]. Необходимо также, чтобы данные бактерии обладали высокими адаптивными способностями к неблагоприятным факторам внешней среды в почве и были конкурентоспособными в отношении аборигенной почвенной микрофлоры [Лебедев, 2014].

В это связи необходимо учитывать, что состав экссудатов может отличаться не только в зависимости от вида растения, в рамках одного семейства, но и, в том числе, от сорта [Fatih et al., 2017]. Поэтому использование одного и того же штамма по результатам может серьезно отличаться в отношении влияния на растение и не гарантирует эффективность его использования на других видах растений и сортах. Кроме того [Лебедев, 2021], неблагоприятные внешние факторы, такие как почвенная засуха, могут резко нивелировать результаты от применения ризобактериальных штаммов.

Результаты наших многолетних опытов показали положительный эффект от инокуляции семян растений семейства капустных (*Brassicaceae* Burnett.). Вегетационные опыты закладывались по стандартной методике в вегетационном домике на агробиотстанции РГПУ им. А. И. Герцена в пос. Вырица (Гатчинский район Ленинградской области). Объектами служили однолетние культуры: редька масличная (*Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg.) сорт Радуга (к-8) и горчица белая (*Sinapis alba* L.) сорта Рапсодия (к-4278). Инокуляция семян проводилась непосредственно перед посевом ассоциативными ризобактериальными штаммами, представленными лабораторией экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий ВНИИСХМ (г. Пушкин – Санкт-Петербург): *Variovorax paradoxus*, штамм 5С-2, *Arthrobacter mysorens*, штамм 7 и *Flavobacterium sp.*,

штамм 30. Опыты проводились на супесчаной дерново-слабоподзолистой почве со слабокислой реакцией среды и средней обеспеченностью доступными формами фосфора и калия, а также средним содержанием гумуса (1,5–1,8 %).

В вегетационном домике растения выращивали при 70 % влажности почвы от полной влагоемкости (нормальные условия). Для части растений после вступления их в критический период (фазу бутонизации) создавалась кратковременная почвенная засуха. На протяжении десяти дней влажность почвы не превышала 30 %, а после была повышена до нормальных условий увлажнения и сохранялась на таком уровне до окончания вегетационного периода.

В результате вегетационного опыта установлено негативное влияние недостатка почвенной влаги на такой интегральный ростовой показатель как высота растений. Анализ полученных данных свидетельствует, что предпосевная обработка семян ассоциативными штаммами способна снизить тормозящий эффект на ростовые процессы, которые связаны с влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды. Растения в опытных вариантах с применением инокуляции, подвергнутые кратковременной засухе к фазе активного цветения, были существенно выше необработанных на 23–27 % (горчица белая) и 2–14 % (редька масличная). Наибольший эффект был отмечен при использовании ризобактерий *V. paradoxus* шт. 5С-2 (127 % у горчицы и 114 % у редьки) и *A. mysorens* шт. 7 (123 % у горчицы и 104 % у редьки).

Анализ продуктивности семян показал, что предпосевная обработка культур ассоциативными штаммами увеличивает количество семян (табл.).

Таблица

Урожай семян инокулированных растений при нормальном водоснабжении и после почвенной засухи (на 1 сосуд)

Вариант	Горчица белая				Редька масличная			
	НУ*		ПЗ**		НУ		ПЗ	
	1***	2****	1	2	1	2	1	2
Контроль	492	3,0	282	0,8	554	3,14	372	1,67
<i>Variovorax paradoxus</i> , шт. 5С-2	752	4,2	500	1,4	580	3,77	516	2,49
<i>Arthrobacter mysorens</i> , шт. 7	888	5,4	524	1,5	556	3,72	489	2,31
<i>Flavobacterium sp.</i> шт. 30	832	5,0	488	1,5	602	3,45	452	2,00
НСР _{0,05}	36,4	0,4	22,4	0,3	49,0	0,30	50,8	0,32

Примечание: НУ* – нормальное водоснабжение; ПЗ** – почвенная засуха; 1*** – количество семян (шт./сосуд), 2**** – масса семян (г/сосуд).

Следует отметить, что после переживания недостатка влаги в почве, опытные варианты с применением биопрепаратов, по сравнению с контролем, характеризовались более высокими показателями семенной продуктивности. В отсутствие засухи масса семян у редьки возрастала на 20 % в варианте с *V. paradoxus* шт. 5С-2, а у горчицы на 80 % в опыте с *A. mysorens* шт. 7, относительно контроля. Инокулированные растения при почвенной засухе отличались большей массой семян, чем контрольные на 75–88 % (горчица) и на 20–49 % (редька).

Таким образом, использованные нами ассоциативные ризобактериальные штаммы способны не только положительно влиять ростовые процессы и урожайные показатели семян, но и оказывать протекторный эффект в условиях кратковременной почвенной засухи, снижая ее негативное влияние. Наиболее эффективной по сумме исследованных показателей оказалась предпосевная инокуляция семян горчицы белой (*Sinapis alba* L.) сорта Рапсодия и редьки масличной (*Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg.) сорта Радуга штаммами *Variovorax paradoxus* и *Arthrobacter mysorens*.

Литература

Тихонович И. А., Андронов Е. Е., Борисов А. Ю., Долгих Е. А., Жернаков А. И., Жуков В. А., Проворов Н. А., Румянцева М. Л., Симаров Б. В. Принцип дополнителности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // Генетика. 2015. Т. 51, № 9. С. 973–990.

Воробейков Г. А., Дмитриева О. М., Павлова Т. К., Лебедев В. Н. Повышение урожайных показателей редьки масличной путем инокуляции семян ассоциативными ризобактериями // Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия : тез. докл. Междунар. конф., 19–23 сент. 2005 г., Вологда. Вологда, 2005. С. 37.

Шапошников А. И., Белимов А. А., Кравченко Л. В., Виванко Д. М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 16–22.

Лебедев В. Н. Ассоциативные штаммы бактерий как современный элемент экологизации выращивания капустных растений // Известия РГПУ им. А. И. Герцена. 2014. № 168. С. 49–53.

Fatih C., Murat E., Mehmet S., Arzu C. The role of beneficial microorganisms in the protection of plants growing in natural landscape areas // Siirt. 2017. P. 427–442.

Лебедев В. Н., Воробейков Г. А., Ураев Г. А. Физиологическая особенность и продуктивность горчицы белой при инокуляции семян ассоциативными ризобактериями при нормальном увлажнении и почвенной засухе // Пермский аграрный вестник. 2021. № 3. С. 52–58.

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ СТРЕПТОМИЦЕТОВ НА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ ИЗ-ЗА СКЛОННОСТИ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНКИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО УДОБРЕНИЯ

Е. И. Маградзе

Удмуртский государственный университет
Ижевск, e-mail: elena.magradze@gmail.com

Стрептомицеты в качестве почвенных бактерий, синтезирующих большой спектр веществ полезных для растений, могут активно применяться как бактериальные удобрения. Эти прокариоты непритязательны в питании, поэтому биоудобрения, содержащие стрептомицеты, можно выращивать на отходах пищевых производств [Mohanasrinivasan, 2013]. Таким отходом является молочная сыворотка, которая в большом количестве получается при производстве творога и сыра.

Для получения удобрения мы выращиваем стрептомицеты *Streptomyces coelicolor* на стерильной, разбавленной водой молочной сыворотке. Пересев стрептомицетов мы осуществляем с жидкой среды Ваксмана, на поверхности которой стрептомицеты образуют сплошную пленку. Перед пересевом содержимое колбы встряхивается для более или менее равномерного распределения стрептомицетов по всему объему культуральной жидкости.

Так как питательная среда для удобрения жидкая, и мы не перемешиваем колбы во время культивирования, то стрептомицеты через 7 дней тоже образуют на поверхности молочной сыворотки сплошную пленку. Мы определяем концентрацию стрептомицетов в молочной сыворотке методом Коха, готовя последовательные десятикратные разведения, сразу после посева и после культивирования. Но если непосредственно после посева стрептомицеты распределяются по всему объему жидкости, то после культивирования они собираются на поверхности питательной среды. Перед определением концентрации стрептомицетов пленка разбивается путем многократных встряхиваний содержимого колбы, затем мы определяем КОЕ стрептомицетов.

Колонии стрептомицетов в каждой отдельной чашке Петри имеют одинаковый размер. Возможно, это обусловлено тем, что колонии явились результатом размножения спор. Обычно, мы делаем посева на среду Ваксмана из 3-го, 4-го и 5-го разведений, поэтому при разбавлении в 1000 и более раз мицелий в пробирках практически не остается. Таким образом, мы считаем количество стрептомицетов

по прорастающим спорам, но не можем получить достоверную информацию об их количестве. Интересен еще один факт: при последовательных десятикратных разведениях в большинстве случаев мы наблюдаем большой разброс значений по количеству колоний. Часто после посева из большого разведения на твердой среде Ваксмана вырастает больше колоний, чем при меньшем разведении. Это может быть связано с тем, что стрептомицеты не представляют собой отдельные клетки, при последовательных разведениях пленки сильнее разрушаются, больше свободных спор появляется в окружающем пространстве. Во всех экспериментах среднее количество КОЕ стрептомицетов больше после культивирования в молочной сыворотке, чем во время посева. Во всех наших удобрениях количество КОЕ колеблется от 10^6 до 10^7 КОЕ/мл. Однако из-за большого разброса значений разница между средними значениями недостоверна. При этом визуально наблюдается прирост биомассы стрептомицетов. Объясняется это тем, что, несмотря на то что пленка разбивается на достаточно крупные фрагменты, переплетенные гифы стрептомицетов при разведении практически не распадаются на отдельные нити [Виноградова, 2016].

Удобрение применяется после того, как поверхностная пленка разбивается многократным взбалтыванием колбы. После этой процедуры поверхностная пленка уже не восстанавливается.

Мы также проверяли КОЕ стрептомицетов в двух удобрениях, которые остались после опытов с поливом исследуемых культурных растений. Одно удобрение хранилось в холодильнике в течение восьми месяцев, другое – в течение шести месяцев. Биомасса стрептомицетов находилась на дне. В толще удобрения их практически не было. Перед измерением количества стрептомицетов содержимое колб взбалтывалось. Концентрация стрептомицетов составила $1,3 \cdot 10^4$ КОЕ/мл и $1,08 \cdot 10^4$ КОЕ/мл соответственно. Возможно, споры могут долгое время сохраняться активными в жидкой среде, несмотря на то что формируются в воздушном мицелии.

При разработке бактериального удобрения необходимо исследовать кинетические параметры роста стрептомицетов – один из основных критериев, по которым масштабируется процесс получения бактериального удобрения в промышленных условиях. В статьях, посвященных стрептомицетам, подсчет этих микроорганизмов осуществляют методом Коха, метод активно применяется и к таким сложным прокариотам [Рябова, 2014]. Он позволяет отследить увеличение биомассы, однако не позволяет получить точные данные для оптимизации выращивания стрептомицетов.

Литература

- Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин Н. А. Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности» бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2016. Т. 61, № 7-8. С. 33–47.
- Mohanasrinivasan V., SriramKalyan P., Nandi I., Subathradevi C., Selvarajan E., Suganthi V. and Jemimah Naine S. Fermentative production of extracellular pigment from *Streptomyces coelicolor* MSIS1 // Research Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 8, N 4. P. 31–41.
- Рябова О. Г., Широких И. Г. Рост и антифунгальная активность стрептомицетов на фоне повышенной кислотности среды // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 3. С. 100–107.

АНТАГОНИЗМ *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D ПО ОТНОШЕНИЮ ЭНДО-И РИЗОСФЕРНЫМ БАКТЕРИЯМ КАРТОФЕЛЯ СОРТА ЛУГОВСКОЙ

А. С. Мориц, И. С. Петрушин, Ю. А. Маркова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
e-mail: aconitkaaco@gmail.com, ivan.kiel@gmail.com, juliam06@mail.ru

На сегодняшний день для улучшения плодородия почвы широко применяются биопрепараты в качестве биостимуляторов или биоде-структоров различных поллютантов. В то же время микроорганизмы, входящие в состав таких препаратов, неизбежно должны вступать в разнообразные взаимоотношения не только с растением-хозяином, но и с его микробным сообществом. Такое вмешательство может привести к изменению растительного микробиома, вплоть до его перестройки, которая неизбежно отразится на состоянии растения. В лаборатории растительно-микробных взаимодействий СИФИБР СО РАН был выделен и охарактеризован штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D, обладающий способностью разрушать алканы и ПАУ [Беловежец и др., 2017, 2020]. Показано, что данный микроорганизм снимает неблагоприятное воздействие нефти на растения [Treyakova et al., 2019]. В то же время известно, что некоторые штаммы родококка являются продуцентами биологически активных соединений, обладающих антимикробным действием.

Целью данной работы было определить гены, кодирующие вторичные метаболиты в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D и изучить его взаимодействие с бактериями, населяющими эндо- и ризосферу картофеля сорта Луговской.

Объекты и методы исследования. При проведении лабораторных исследований использовались: *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D из коллекции СИФИБР СО РАН, выделенный из ризосферы

Elytrigia repens (Пырей ползучий), произрастающего на нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области; бактерии, выделенные из эндо- ризосферы картофеля сорта Луговской на территории бассейнов рек Малой Олхи и Большой Олхи на юго-западе Прибайкалья. Бактерии (маточную культуру) культивировали на твердом субстрате ГМФ-агаре (ООО «НИЦФ») при температуре 26 °С. Выделенные из эндо- и ризосферы картофеля бактерии определяли методом окраски по Граму, антагонистическую активность – методом перпендикулярных штрихов и диско-диффузионным методом.

С помощью веб-сервиса AntiSMASH предсказано наличие 8 генов, кодирующих нерибосомные пептидсинтетазы, в том числе гетеробактин А (100 % гомология) и эритрохелин (57 % гомология). Это позволило нам предположить, что исследуемый микроорганизм обладает способностью синтезировать соединения с антимикробной активностью.

На следующем этапе работы изучалось влияние родоккка на эндофитные и ризосферные бактерии. Из ризосферы картофеля сорта Луговской было выделено 28 культур. Из них одна была грамотрицательной, 23 культуры обладали спорами. Из эндосферы выделено 46 культур, три из них были грамотрицательными, 17 грамположительных культур обладали способностью к спорообразованию. Клетки трех культур имели вид длинных ветвящихся нитей, напоминающая морфологию актиномицетов.

При изучении воздействия *R. qingshengii* VKM Ac-2784D на эндо- и ризосферные бактерии мы установили, что он обладает высокой антагонистической активностью. Отсутствие зоны подавления роста отмечено только для 9 эндофитных бактерий (19,6 %). Для остальных изолятов диаметр зоны подавления роста колебался от 1,33 до 7 мм (рис.).



Рис. Выявление продукции вторичных метаболитов *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D диско-диффузионным методом

Таким образом, *R. qingshengii* VKM Ac-2784D синтезирует соединения с антимикробной активностью. Предполагается, что данный микроорганизм в составе биологических препаратов способен оказывать модулирующее воздействие на микробиом растений и почвы.

Литература

Беловежец Л. А., Макарова Л. Е., Третьякова М. С., Маркова Ю. А., Дударева Л. В., Семенова Н. В. Возможные пути деструкции полиароматических углеводородов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо-и ризосферы растений // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. № 53(1). С. 76–81.

Беловежец Л. А., Маркова Ю. А., Третьякова М. С., Клыба Л. В., Санжеева Е. Р. Деструкция парафиновой фракции нефти микроорганизмами // Химия и технология топлив и масел. 2020. № 6. С. 48–52.

Третьякова М. С., Иванова М. В., Беловежец Л. А., Маркова Ю. А. Возможное использование микроорганизмов-нефтедеструкторов для защиты растений, произрастающих в условиях нефтяного загрязнения // Науки о Земле и окружающей среде. 2019. Т. 315, № 7. С. 72–46.

НОВЫЕ БИОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ И ВОД ОТ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Ю. А. Николаев¹, Г. И. Эль-Регистан¹, Е. В. Демкина¹
Н. Г. Лойко¹, И. А. Борзенков¹, А. Е. Иванова¹, Т. А. Канапацкий¹
И. В. Перминова², А. И. Константинов², А. Б. Воликов²
А. Н. Хрептугова², И. В. Близнец³

¹ФИЦ биотехнологии РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

³ЗАО БНТ, Технопарк МГУ, Москва

Повышение стабильности биопрепаратов углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), используемых для биоремедиации объектов окружающей среды, загрязненных нефтепродуктами, является актуальной задачей.

В настоящем исследовании разработаны новые биокomпозитные материалы для иммобилизации УОМ на поверхности микрокапсул (МК) из: полимочевины чистой или модифицированной хитозаном или желатином; МК из полимолочной или полигликолевой кислот; а также включения в гели из силанольных производных гуминовых кислот.

Объектами исследования были: углеводородокисляющие микроорганизмы: *Acinetobacter seifertii* WS1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *P. aeruginosa* OIS 4.8.1, *Rhodococcus qingshengii* 367-6, *Dietzia maris* 367-2, *A. junii* 2-1, *Mycobacterium* sp. AGS10, а также дрожжи *Yarrowia lipolytica* 367-2.

Использование МК на основе полимочевины с хитозаном (но не чистой полимочевины или с желатином) повышало численность жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) в 2–5 раз по сравнению с контрольными вариантами (без МК) как в свежевывращенных культурах, так и культурах длительно (до 7 мес.) хранящихся при комнатной температуре и доступе воздуха.

При хранении в течение 1 мес. при комнатной температуре варианта с МК из полимолочной кислоты выживало на 3 порядка больше клеток, чем в контроле (без МК). На поверхности МК из полимолочной кислоты развивалась обильная биопленка, капсулы быстро разрушались при хранении.

Наиболее эффективным было включение УОМ в гели из силанольных производных гуматов: в таких препаратах после 7–12 мес. хранения титр КОЕ был выше, чем в контрольном варианте до 100 раз. Биопрепараты на основе новых биокomпозитных материалов с иммобилизованными УОМ обладали высокой метаболической активностью, окисляя углеводороды. Важными для практического применения свойствами новых биокomпозитных материалов являются: пролонгирование жизнеспособности клеток УОМ при длительном (до 12 мес.) хранении; гомогенность культур в период их применения; наличие дополнительных субстратов роста, также используемых для соокисления углеводородов.

Обсуждаются причины обнаруженного неестественно длительного выживания микроорганизмов в силанольно-гуматных гелях.

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОИСКА И АНАЛИЗА
CRISPR-CAS СИСТЕМ В ГЕНОМЕ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE КАК ПЛАТФОРМА СОЗДАНИЯ
ПЕРСониФИЦИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ**

Л. А. Степаненко¹, А. Ю. Борисенко¹, Б. Г. Сухов², Т. В. Конькова²,
Ю. П. Джиоев¹, В. И. Злобин¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск
e-mail: steplia@mail.ru

²ФГБУН Институт химической кинетики и горения
им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск

CRISPR-Cas система (короткие палиндромные повторы с регулярно расположенными интервалами) – это передовая технология, которая произвела революцию в области геномной инженерии как простая, дешевая и быстрая методика редактирования генома. В своем естественном контексте система CRISPR-Cas является генетическим элементом адаптивного иммунитета бактерий и архей. Она хранит информацию об инородной ДНК, с которой встречалась прокариотическая клетка, в виде массивов CRISPR, состоящих из приобретенных фрагментов чужеродной ДНК (спейсеры), разделенных палиндромными повторами. Спейсеры полностью интегрированы в геном клетки и передаются ее потомкам при делении. Механизм действия CRISPR-Cas систем обычно разделяют на три стадии: 1) приобретение новых спейсеров, или адаптация; 2) транскрипция CRISPR-кассеты и процессинг пре-сгРНК на короткие направляющие сгРНК-фрагменты; 3) интерференция, во время которой происходит специфическое распознавание и уничтожение чужеродных генетических элементов [Hille, 2016]. Таким образом, системы CRISPR/Cas защищают клетки бактерий от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей инородной ДНК. В последние десятилетия, несмотря на достижения в диагностике, терапии и вакцинации, инфекционные заболевания по-прежнему остаются одной из основных проблем во всем мире [Fauci, 2012]. Бактерии *Klebsiella pneumoniae* входят в группу лидирующих бактерий-оппортунистов, обладающих множественной антибиотикорезистентностью (ESKAPE). Являются причиной развития различных инфекционных заболеваний человека, а также нозокомиальных инфекций. Наши исследования посвящены изучению разнообразия и функциональности CRISPR/Cas систем как противовирусных иммунных агентов бактерий. Поэтому изучение CRISPR/Cas-системы *Klebsiella pneumoniae* позволит получить информацию о фагоустойчивости исследуемых штаммов бактерий и

разработать современные подходы в лечении сложных инфекционных заболеваний путем создания таргетной фаговой терапии.

Цель: с помощью биоинформационного программного алгоритма провести поиск и анализ CRISPR/Cas систем в геномах *Klebsiella pneumoniae*, для дальнейшего подбора высокоспецифичных бактериофагов.

Материалы и методы: в качестве объекта были взяты 147 полногеномных последовательностей *Klebsiella pneumoniae*, загруженные из базы данных GenBank. Для поиска генов CRISPR-систем, повторяющихся повторов и спейсеров в расшифрованных геномных последовательностях *Klebsiella pneumoniae* был использован разработанный нами биоинформационный программный алгоритм, который осуществлялся при помощи ряда отобранных программ [Борисенко, 2018]. Для поиска локусов CRISPR/Cas-систем и генов Cas, определения их функциональных и структурных характеристик использовали три программных моделирования: MacromolecularSystemFinder (MacSyF, ver. 1.0.2), с вспомогательными пакетами makeblastDB (ver.3.0) и HMMER (ver. 2.2.28), и онлайн доступных софтов: CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) и CRISPROne (<https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/>). Обнаружение повторяющихся последовательностей осуществляли при помощи ряда программ: CRISPI: CRISPR-interactivedatabase (<http://crispi.genouest.org/>); CRISPRsFinder (<http://crispr.u-psud.fr/>); CRISPRDetect: (http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.html). Для детекции бактериофагов в обнаруженных спейсерных участках использовали программу CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html). Результаты считались достоверными при совпадении повторов и спейсеров в ряде программ.

Результаты и обсуждение: с помощью данного алгоритма в 52 из 147 исследованных штаммов *Klebsiella pneumoniae* были обнаружены CRISPR / Cas системы. Они были отобраны для дальнейшего исследования. При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR/Cas-системах исследуемых штаммов было определено наличие одной (53,8 % случаев) и двух CRISPR-кассет (46,2 %). Рядом с кассетами во всех случаях был идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для систем Type-I Subtype-I-E (cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8, cas3), что свидетельствует о функциональной способности CRISPR-систем бактерий. Анализ спейсерного со-

става CRISPR-кассет показал, что совокупное количество выявленных спейсеров составило 1659. Из них 281 спейсер повторялись в двух и более CRISPR-кассетах, 505 спейсеров не имели повторов. Количество спейсеров в кассетах составляло от 4 до 64. Консенсусные последовательности повторов всех найденных CRISPR-кассет были достаточно разнообразны, что может свидетельствовать о различном происхождении исследуемых штаммов, либо о широкой циркуляции данных штаммов и обмене генетической информацией между представителями одного или разных видов. Из 52 исследуемых штаммов у 20 были определены гены устойчивости к антибактериальным препаратам (по данным GenBank). Из них 90 % имели устойчивость к β -лактамам (карбапенемаза), и по 5 % к рифампицину и триметоприм-сульфаметоксазолу. Три штамма из данной группы обладали множественной резистентностью и были определены как панрезистентные. Данные штаммы имели некоторое сходство в спейсерном составе, хотя были выделены в разное время и в разных странах мира. Скрининг фагов через спейсерные последовательности показал, что в CRISPR-кассетах исследуемых штаммов спейсеры имели полное соответствие протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий рода *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* и рода *Pseudomonas*, семейства *Pseudomonadaceae*. С помощью использованных программ удалось определить полное название бактериофагов и их номер доступа в GenBank. Таким образом, использованный биоинформационный алгоритм позволил дать полную характеристику геномных структур CRISPR/Cas-систем штаммов *Klebsiella pneumoniae*, а также получить информацию о фагоустойчивости исследуемых штаммов, что в дальнейшем позволит разработать подходы к созданию персонифицированной фаготерапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00449, <https://rscf.ru/project/22-25-00449/>.

Литература

Борисенко А. Ю., Джиоев Ю. П., Перетолчина Н. П., Степаненко Л. А., Кузьмина В. А., Кокорина Л. А., Землянская Ю. М., Арефьева Н. А., Злобин В. И. Биоинформационный поиск и анализ структур CRISPR/Cas-систем в геноме штамма *Staphylococcus aureus* и оценка профилей фаговых рас, детектируемых через CRISPR-кассету бактерий // *ActaBiomedicaScientifica*. 2018. Т. 3, № 5. С. 49–53.

Fauci A. S., Morens D. M. The perpetual challenge of infectious disease // *N Engl J Med*. 2012. Vol. 366. P. 454–461. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1108296>

Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Vol. 371. P. 20150496. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>

ИЗУЧЕНИЕ БИОПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБВОДНЕННЫХ МЕРЗЛЫХ ПОРОД

А. М. Субботин, С. А. Петров, Т. В. Маркевич
В. А. Мальчевский, Н. О. Ренёв

ТюмНЦ СО РАН, Отдел биоресурсов криосферы, г. Тюмень
e-mail: tumiki@yandex.ru

Обводненные мерзлые породы (ОМП) Сибири являются уникальной кладовой микроорганизмов, обладающих высоким адаптационным потенциалом, позволяющим им длительное время сохранять жизнеспособность в неблагоприятных условиях среды. К отрицательным факторам среды относятся специфический гидрологический и физико-химический режим в ОМП, недостаток питательных веществ, затрудненный обмен метаболитами, радиационный фон и др. [Ривкина и др., 2019]. В то же время стабильно низкие температуры ОМП имеют стабилизирующий характер, способствующий сохранению бактериальных сообществ [Гиличинский, 2002]. Сохраняющая жизнеспособность микробиота переходит в состояние гипометаболизма и «спящие», неактивные формы. Соответственно, к этим условиям должны адаптироваться биохимические и репарационные механизмы, система обмена информацией через сигнальные молекулы [Хмель, 2008, Олескин, 2016], обеспечивающие стрессоустойчивость и выживание бактериальных сообществ в неблагоприятных условиях среды. Таким образом, микробиоту ОМП можно рассматривать как длительно сохраняющийся биологический ресурс криолитозоны с уникальными биохимическими свойствами. В Тюменском научном центре Сибирского отделения РАН создана коллекция бактериальных культур, выделенных из образцов многолетнемерзлых дисперсных обводненных пород, отобранных на территории Западной и Восточной Сибири из береговых обнажений рек Алдан, Чара, и кернов, полученных при бурении скважин в районе Тарко-Сале. Чистые культуры выделенных бактерий явились объектом исследования их биопотенциала, влияния на морфофизиологические параметры растений и животных.

Результаты исследований. У 15 штаммов бактериальных культур, выделенных из ОМП, определено содержание биогенных аминов: серотонина, дофамина и кортизола, методом иммуноферментного анализа [Зайко, 2009] Определение проводили в суспензии клеток (концентрация 1×10^9 КОЕ/мл) в дистиллированной воде. Во всех исследованных штаммах наблюдается продукция кортизола от 391,8 до

530 нмоль/л. Наиболее высокая концентрация кортизола определена у 7 штаммов (от 470,5 до 530 нмоль/л). Контроль 189,7 нг/мл. Наиболее значимая продукция серотонина наблюдается у 3 штаммов (от 191,3 до 212,5 нг/мл). Контроль 215,3 нг/мл. Дофамин в значительных количествах продуцируется 5 штаммами от 107,5 до 30,75 нг/мл. Контроль – 0,13 нг/мл. Для дофамина, серотонина и кортизола контролем служила сыворотка крови здорового мужчины 50 лет.

В клинической лаборатории Тюменского кардиологического научного центра методом ИФА в смывах бактериальных культур с поверхности питательной среды физиологическим раствором определяли наличие соматотропного гормона (СТГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), эстродиола (Эстр), адренокортикотропный гормон (АКТГ), с целью выявления гормоноподобных веществ, а также норадреналин (Над), интерлейкины (ИЛ1d и ИЛ10). В исследованных бактериальных культурах в значительных концентрациях определяется; СТГ – у 2 штаммов, ФСГ – у 7 штаммов, Эстр – у 3 штаммов, АКТГ – у 5 штаммов, Над – у 6 штаммов, ИЛ1b – у 4 штаммов и ИЛ10 – у 6 штаммов.

В супернатанте исследуемых бактериальных штаммов, выделенных из ОМП, детектируется наличие кортизола, серотонина и дофамина, что явилось основанием для изучения их влияния на психофизиологические характеристики животных. Исследовали 2 штамма рода *Bacillus*. Штамм В1М продуцирует серотонин и дофамин в количестве в 8 и в 5 раз, соответственно, больше, чем штамм В2СН. В исследовании использовали цыплят бройлеров «Кросс РОСС». Цыплят выпаивали водой, содержащей *Bacillus sp* штаммы В1М и В2СН в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл. Наблюдение за поведением подопытных птиц проводили на 14 сутки после вылупления с использованием теста «открытое поле». В процессе опыта учитывали двигательную активность, определяли акссиметрию полушарий и психическое состояние. Выпаивание цыплятам штамма В1М повышало их исследовательскую активность, общую возбудимость и снижало уровень стресса, в отличие от штамма В2СН. В обеих группах наблюдается повышение уровня тревожности, и активация парасимпатической части вегетативной нервной системы. При этом под влиянием штаммов *Bacillus sp* наблюдается явная моторная психофизиологическая латерализация функции головного мозга: при воздействии В1М в 4 раза выраженнее функционирует левое полушарие, а при воздействии В2СН – правое полушарие (в 2 раза). Таким образом, штаммы бактерий рода *Bacillus sp*. из ОМП через микробные паттерны и образрас-

познающие рецепторы (pattern recognition receptors – PRRs) ЖКТ оказывают существенное влияние на развивающиеся системы цыплят *Gallus gallus* в раннем постнатальном периоде, модифицируя поведенческие реакции и их психоэмоциональное состояние. Нами пока рассматривается возможность использования нового класса психобиотиков на основе штаммов из ОПП для разработки новой группы лечебных препаратов, направленных на улучшение психического здоровья человека

Исследовано влияние препарата, содержащего комплекс вторичных метаболитов *Bacillus sp* штамма В2СН на исход экспериментальной закрытой нейротравмы головного мозга у крыс и на репарацию экспериментальной механической эрозии эпителия роговицы глаза у кроликов. В эксперименте показано, что метаболиты штамма В2СН обладают протективным эффектом при закрытой нейротравме головного мозга, снижая смертность животных в 10 раз. Инстиляция в глаз метаболитов при экспериментальной травме роговицы глаза способствует эпителизации дефекта в 2,5 раза быстрее, чем препарат «Солкосерил». Метаболиты *Bacillus sp* штамма В2СН могут быть основой для разработки лекарственных препаратов.

Исследована урожайность растений картофеля, выращенных из меристемных культур, обработанных метаболитами бактерий из ММП. Показано, что добавление метаболитов в питательную среду, при выращивании меристемных растений приводит в дальнейшем к увеличению массы и количества клубней в кусте растения.

Исследования выполнялись согласно Государственному заданию на 2021–2030 гг. «Пространственно-временные явления и процессы, происходящие в водах суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата» (Приоритетное направление 1.5.11. Программа 1.5.11.1).

Литература

Гиличинский Д. А. Криобиосфера позднего кайнозоя: вечная мерзлота как среда сохранения жизнеспособных микроорганизмов : автореф. дис. ... д-ра геол.-минерал. наук. 2002.

Зайко С. Д. Определение биогенных аминов в лабораторной практике // Клинико-лабораторный консилиум. 2009. № 4 (29). С. 54–60.

Олескин А. В., Эль-Регистан Г. И., Шендеров Б. А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. Т. 85, № 1. С. 3–25.

Ривкина Е. М., Спирина Е. В., Шатилович А. В., Шмакова Л. А., Абрамов А. А. Микроорганизмы вечной мерзлоты в космическом пространстве: Результаты эксперимента «Экзобиофрост» // Криосфера Земли. 2019. Т. 23, № 6. С. 27–36.

Хмель И. А., Белик А. С., Зайцев Ю. В., Данилова Н. Н. Quorum sensing и коммуникация бактерий // Вестник Московского университета. Сер. 16, Биология. 2008. № 1 С. 28–33.

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА И ПРОДУКЦИИ БИОПАВ
ПСИХРОТРОФНОГО ШТАММА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА
RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS F2-2
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗНЫХ СУБСТРАТАХ
В УСЛОВИЯХ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ**

Н. Я. Чайка¹, А. А. Режепова², Л. И. Ахметов³
И. Ф. Пунтус^{1,3}, К. В. Петриков³, А. Е. Филонов^{1,3}

¹Тульский государственный университет, Тула, e-mail: чайка_nelli@mail.ru

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино
e-mail: liregepova@gmail.com

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН
Пушино, e-mail: lenarakhmetov@yandex.ru, puntus66@mail.ru, bioscience.kp@gmail.com,
filonov.andrey@rambler.ru

Активность микроорганизмов является одним из главных факторов, способствующих естественной очистке почв и водоемов. Актинобактерии рода *Rhodococcus* утилизируют разнообразные органические субстраты (дизельное топливо, различные алканы: гексадекан, додекан, ундекан, декан и др.). БиоПАВ гликолипидной природы, продуцируемые родококками, способны эмульгировать гидрофобные субстраты, увеличивая их доступность для биодеградации.

Целью данной работы являлось исследование ростовых параметров и поверхностно-активных свойств штамма-нефтедеструктора *Rhodococcus erythropolis* F2-2 при росте в условиях низкой температуры при 5 °С на гексадекане или глюкозе.

Штамм *R. erythropolis* F2-2 из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ им. Г. К. Скрыбина РАН выделен из образцов нефтезагрязненных почв Фестивального месторождения Ямало-Ненецкого автономного округа. При росте в жидкой среде Эванса с гексадеканом эффективно снижает поверхностное натяжение за счет продукции биосурфактантов. В данной работе были построены кривые роста, а также определены удельная скорость роста, динамика снижения поверхностного натяжения и содержание углеводов в культуре штамма *R. erythropolis* F2-2 при росте на гексадекане в перерасчете на треалозу в условиях низкой температуры при 5 °С.

Ранее [Чайка и др., 2021] были исследованы ростовые параметры штамма *R. erythropolis* F2-2 при росте на гексадекане при температуре 28 °С. Численность микроорганизмов (КОЕ) достигала максимума к 29-му часу роста (4×10^8 КОЕ/мл). При культивировании на гексадекане в условиях низкой температуры максимальная численность *R. erythropolis* F2-2 была достигнута на 12-е сут. опыта ($8,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл).

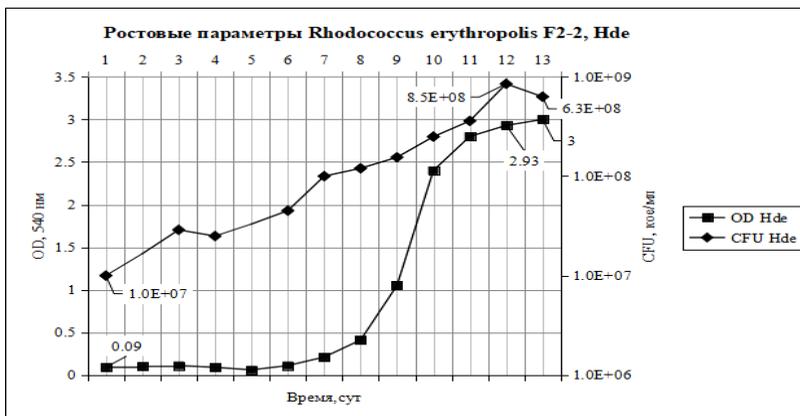


Рис. 1. Оптическая плотность и численность культуры штамма *R. erythropolis* F2-2 при периодическом культивировании на гексадекане в минерально-солевой среде Эванса при 5 °С, где OD – оптическая плотность, CFU – численность колонеобразующих единиц

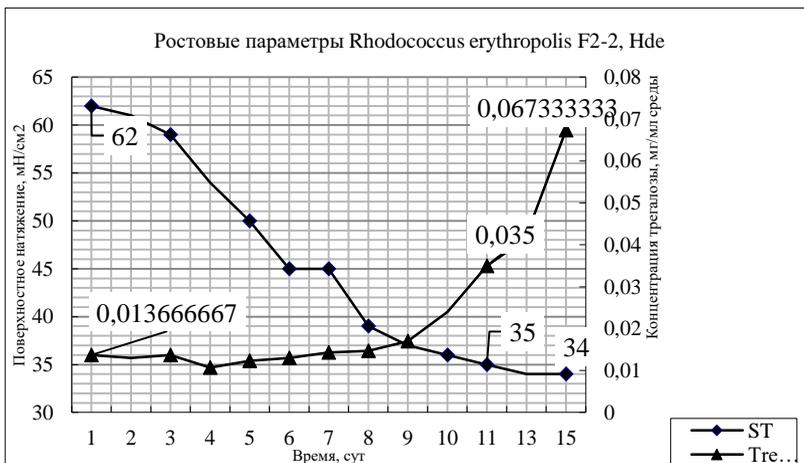


Рис. 2. Содержание трегалолипидов и поверхностное натяжение в культуре штамма *R. erythropolis* F2-2 при периодическом культивировании на гексадекане в среде Эванса при 5°С, где Tregalose – содержание трегалолипидов, ST – поверхностное натяжение

Далее, на 13-е сут., их численность снизилась, в то время как оптическая плотность продолжила расти. Можно предположить, что, несмотря на фазу отмирания, родококки, по-видимому, продолжают

синтезировать биосурфактанты, за счет чего увеличивается оптическая плотность. При 28 °С максимальная удельная скорость роста была равна 0,4 ч⁻¹, при 5 °С – 0,014 ч⁻¹.

Поверхностное натяжение при 28 °С снижалось до 29 мН/м, при этом продукция трегалолипидов составила 1,6 мг/мл; при 5 °С поверхностное натяжение снизилось до 34 мН/м, продукция трегалолипидов составила 0,7 мг/мл.

При росте на глюкозе, как при обычной, так и при пониженной температуре, продукции биоПАВ практически не отмечалось, поверхностное натяжение снижалось лишь до 63 мН/м.

В условиях низкой температуры штамм *R. erythropolis* F2-2 растет медленнее, но способен утилизировать *n*-алканы (декан, ундекан, додекан, гексадекан), а также дизельное топливо и нефть. Он обладает выраженными поверхностно-активными свойствами: продуцирует биосурфактанты трегалолипидной природы и снижает поверхностное натяжение до 34 мН/м. Исследуемый штамм-нефтедеструктор перспективен для использования в составе биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений. Изученные ростовые параметры штамма *Rhodococcus erythropolis* F2-2 будут использованы при получении его биомассы для ПЦР в реальном времени и РНК-секвенирования (транскриптомного анализа) с целью изучения экспрессии генов, вовлеченных в синтез биоПАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00002 «Особенности синтеза поверхностно-активных соединений бактериями, эффективно утилизирующими нефть при пониженных и повышенных температурах».

Литература

Чайка Н. Я., Кузнецов А. В., Ахметов Л. И., Филонов А. Е., Пунтус И. Ф. Ростовые параметры и поверхностно-активные свойства штамма-нефтедеструктора *Rhodococcus erythropolis* F2-2 при росте на гексадекане и глюкозе // Экоотоксикология-2021 : материалы Всерос. конф. с междунар. участием и элементами науч. для молодежи, 7–8 окт. 2021 г. Тула : Изд-во ТулГУ, 2021. С. 203–204.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Авданина Д. А. 21, 220
Адамович С. Н. 32
Александров А. И. 26
Александрова Г. П. 211
Александрова С. С. 255
Алешкин А. В. 177
Андронов Е. Е. 182
Арефьева Н. А. 32, 78, 121,
167, 223, 248
Артамонова О. А. 152
Артемов Г. Н. 123
Ахметов Л. И. 284

Б

Бабусенко Е. С. 226
Бадалян О. А. 137
Бажутин Г. А. 228
Баймиев А. Х. 188
Балкин А. С. 117, 128, 165
Басалаева Д. Л. 118
Бахарева Д. А. 24, 109
Безаргикова К. У. 211
Бектурганова Б. Ш. 40
Белова М. Г. 130
Беловежец Л. А. 186, 211
Белькова Н. Л. 191, 206
Бидюк В. А. 26
Близнец И. В. 276
Бобушева С. Т. 40
Бондаренко С. А. 89
Бондаренкова А. Д. 15
Борзенков И. А. 276
Борисенко А. Ю. 121, 167, 223,
248, 278
Борисов Б. А. 180
Бочкова Е. А. 114

Бурлак В. А. 123
Буторова И. А. 226
Бынина М. П. 28
Бычкова А. А. 230

В

Варижук А. М. 104
Васильева Б. Ф. 258
Васильченко А. С. 126, 209, 244,
251, 253
Васильченко А. В. 126
Ведяйкин А. Д. 104
Вершинина З. Р. 188
Воликов А. Б. 276
Воробейков Г. А. 232
Воробьев Р. С. 123
Воробьева С. С. 72
Воропаева Н. М. 191, 206
Вычик П. В. 155
Вятчина О. Ф. 32, 78, 223

Г

Гаврильева Л. Ю. 365
Гаврюшина И. А. 235
Ганенко Т. В. 211
Ганнесен А. В. 114
Гаськова А. С. 45
Георгиева М. Л. 235
Герасимчук А. Л., 238
Гераськина О. В. 114
Гесслер Н. Н. 59
Глинская Е. В. 92, 118, 130, 267
Глухова А. А. 246, 258
Глуховской Е. Г. 267
Глызина О. Ю. 69
Говорун В. М. 104, 170
Гоголев Ю. В. 117, 128

Гоголева Н. Е. *117, 128*
Гололобова А. В. *98*
Голубев С. Н. *15*
Гольщева А. А. *241*
Горелова О. А. *24, 109*
Граскова И. А. *214*
Григорова Е. В. *206*
Григорьева А. С. *32, 78*
Грозина А. А. *50*
Гурина Е. В. *244*
Гутник Д. И. *163*

Д

Данилова Н. Д. *114*
Данилова О. А. *35, 89, 95, 114*
Данилова О. Н. *87*
Демкина Е. В. *276*
Демьянкова М. В. *246, 258*
Дерябина Ю. И. *59*
Десницкий А. Г. *37*
Джиоев Ю. П. *32, 78, 121, 167, 223, 248, 278*
Дилбарян Д. С. *251, 253*
Доманская О. В. *253*
Доолоткельдиева Т. Д. *40*
Дубровин А. В. *50*
Дубровская Е. В. *15*
Думина М. В. *255*
Дунаева М. Н. *133*
Дымнич А. С. *130*
Дюбо Ю. В. *155*
Дювенжи Е. В. *114*

Е

Евстигнеева С. С. *118*
Евсютина Д. В. *104, 170*
Евтушенков А. Н. *160*
Еникеев А. Г. *43*
Ефименко Т. А. *246, 258*
Ефременкова О. В. *246, 258*

Ж

Жгун А. А. *21, 217, 255*

Жгун Е. С. *135*
Жданов Д. Д. *255*
Жданова И. Н. *152*
Журина М. В. *114*

З

Загоруйко В. И. *220*
Зайцев П. А. *24, 109*
Зайцева А. А. *24, 109*
Зайцева Ю. В. *48, 230*
Захарова О. В. *146*
Зацаринная Е. А. *45*
Здоровенко Э. Л. *114*
Зиганьшин Р. Х. *114*
Злобин В. И. *32, 48, 78, 121, 167, 223, 248, 278*
Зубова К. В. *267*
Зулькарнеев Э. Р. *177*

И

Иванова А. Е. *276*
Иванова Е. В. *220*
Ивасенко Д. А. *238*
Ившина И. Б. *228, 241*
Ильина Е. Н. *135*
Ильина Л. А. *50, 59*
Исакова Е. П. *59*

Й

Йылдырым Е. А. *50*

К

Калинович А. Е. *262*
Калиткина К. А. *50*
Канапацкий Т. А. *276*
Каневский М. В. *267*
Карабанова А. А. *258*
Кардонский Д. А. *217*
Каропова М. С. *146*
Карноухова О. Г. *121*
Карпова Н. В. *217*
Касымова А. А. *238*
Кашеярова Н. М. *53*

Каюмов А. Р. 203
Киенская К. И. 226
Кириленко К. М. 123
Киселева А. А. 114
Кичко А. А. 182
Кишковская С. А. 220
Клейменова Е. А. 226
Козлова И. А. 56
Кокколова Л. М. 265
Кокорева А. С. 59
Колубако А. В. 137, 155
Колупаева Л. В. 45
Колупаева Н. В. 45
Конанов Д. 135
Коннова Т. А. 117
Кононова Л. И. 61
Константинов А. И. 276
Конькова Т. В. 278
Коробейникова А. С. 92
Коробов В. П. 61
Корсун Д. А. 165
Коханенко А. А. 123
Кочкин Д. В. 109
Кочкина Г. А. 35
Крисанова В. А. 226
Крук А. Н. 155
Кубланов И. В. 98
Куварица А. Е. 235
Кудинова А. Г. 64
Кузнецова В. А. 267
Кузнецова М. В. 152, 197
Кузьмина Л. Ю. 128
Кукушкина В. И. 21
Курлюк Э. В. 140
Курчак Н. 182

Л

Лавина А. М. 188
Лагоненко А. Л. 160
Ладанова М. А. 143, 157
Лаптев Г. Ю. 50
Лебедев В. Н. 269
Лебедева Н. А. 165

Лебединский А. В. 98
Лемкина Л. М. 61
Литвиненко Л. В. 241
Лобакова Е. С. 111
Лобакова Е. С. 24, 109
Лобко В. В. 149
Лойко Н. Г. 276

М

Магомедова А. Д. 171, 174, 177
Маградзе Е. И. 272
Майкова О. О. 69
Макарова А. Э. 78
Макарова Л. Е. 146
Максимова Л. А. 194
Малахова Т. В. 149
Мальцева А. И. 98
Мальчевский В. А. 281
Манувера В. А. 104
Манучарова Н. А. 111
Маракаев О. А. 48, 230
Марданов А. В. 220
Маркевич Т. В. 281
Маркова Ю. А. 146, 186
Маркова Ю. А. 223, 248, 274
Мартъянов С. В. 114
Масленникова И. Л. 197
Маслова О. А. 67
Матосова Е. В. 28, 200
Мелехин М. С. 165
Миндлин С. З. 18
Миронова А. В. 203
Митина Г. В. 180
Михайловская В. С. 152
Молотков В. В. 50
Мориц А. С. 146, 186, 274
Муратова А. Ю. 15
Мурашова А. И. 149
Мурзина Ю. И. 92
Мхитаров В. А. 171, 177

Н

Неволина Е. Д. 114

Некрасова И. В. 197
Немченко У. М. 206
Нечаева О. В. 92
Никельшпарг М. И. 118
Николаев Ю. А. 276
Николайчик Е. А. 137, 155
Никонова А. А. 69
Никонова А. А. 72
Новикова О. Б. 143, 157
Носова А. И. 167

О

Оболкин В. А. 72
Оборина Е. Н. 32
Овчарова М. А. 114
Олехнович Е. И. 135
Орлова О. В. 182
Осипова Е. В. 117

П

Панкратов Д. В. 133
Пенькова Е. В. 165
Перетолчина Н. П. 121, 248
Перминова И. В. 276
Песоцкая К. Ю. 160
Петриков К. В. 284
Петров С. А. 281
Петрова М. А. 18, 64, 67
Петрушин И. С. 163, 274
Пименов Н. В. 149
Пинаев А. Г. 182
Плакунов В. К. 114
Покровская Е. В. 135
Покровская М. В. 255
Пономарева Е. С. 50, 75, 259
Портная Я. А. 32, 78, 121, 167, 248
Потапов М. П. 217
Потехин А. А. 165
Пошвина Д. В. 126
Приставка А. А. 167, 223
Пунтус И. Ф. 284
Пушмина Е. О. 163

Р

Равин Н. В. 220
Ракова Е. Б. 121
Режепова А. А. 284
Рекославская Н. И. 84
Ренёв Н. О. 281
Рогожин Е. А. 126, 235
Роденко К. А. 118
Рубаненко Н. А. 32, 78
Русакowa Д. А. 81

С

Савилов Е. Д. 206
Садыкова В. С. 235
Саловарова В. П. 121, 167, 223
Саляев Р. К. 84
Самульцев Д. О. 211
Семашко Т. А. 170
Семенов А. А. 43
Семинский И. Ж. 121, 248
Сидоренко М. Л. 81
Сидоров Р. 126
Симонова Е. В. 121
Ситникова К. О. 191, 206
Соколов М. Н. 48
Соколов Н. Н. 255
Сорокина Е. А. 21
Степаненко Л. А. 78, 121, 167, 223, 248, 278
Степанов А. А. 209
Степанова С. М. 265
Стрекаловская Е. И. 248
Субботин А. М. 281
Суздальцева А. В. 140
Суровый А. Л. 133
Сухарева Е. С. 206
Сухарева Е. С. 191
Сухов Б. Г. 78, 278
Сухорева М. В. 191, 206
Сысоев А. А. 87
Сысоева И. В. 87

Т

Танащук Т. Н. 220
Татарников С. А. 262
Терехова В. А. 56, 95
Терёшина В. М. 35, 89, 95, 114
Терлецкий В. П. 157
Тетерина Г. А. 121, 167, 223
Ткаченко А. Г. 53, 101, 106
Тризна Е. Ю. 203
Турковская О. В. 15
Тюмина Е. А. 228
Тюрина Д. Г. 50

У

Уланская А. В. 262
Успанова Д. М. 92

Ф

Федорова А. В. 174
Федорова В. С. 123
Федорова М. С. 203
Федосеева Е. В. 56, 95
Федюшкина И. В. 135
Феофанов А. В. 114
Филиппова В. А. 50, 75
Филонов А. Е. 284
Фисунов Г. Ю. 104, 170
Фоменко П. В. 133
Франк Ю. А. 238
Фролов Е. Н. 98

Х

Хакимова Л. Р. 188
Хамо Х. 117
Ханаев И. В. 69
Хаова Е. А. 101
Хомяков Ю. Н. 171, 174, 177
Хомякова Т. И. 171, 174, 177
Хрептугова А. Н. 276

Ц

Цветков В. Б. 104
Цой Е. А. 104, 170

Цыганков В. Ю. 133
Цыганов И. В. 106

Ч

Чайка Н. Я. 284
Чеканов К. А. 24, 109
Чекрыгин С. А. 165
Червяцова О. Я. 128
Черепанова М. А.
Чоглокова А. А.
Чубукова О. В. 188

Ш

Шагимарданова Е. И. 128
Шаламитский М. Ю. 220
Шапиро Т. Н. 111
Шашков Н. А. 182
Шестакова М. В. 135
Шестакова Е. А. 135
Шишлянников С. М. 72
Шруб Е. В. 137

Щ

Щелканов М. Ю. 133
Щелкунов М. И. 114

Э

Эльдаров М. А. 220, 255
Эль-Регистан Г. И. 276

Ю

Юринова Г. В. 167, 223

Я

Ядерец В. В. 217
Яковлева Ю. А. 165
Якушев А. В. 258
Януцевич Е. А. 35, 89, 95, 114
Яшина А. В. 130
Яшников А. В. 126, 253

S

Starcic Erjavec M. 197

Научное издание

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Тезисы докладов
Второй Всероссийской научной конференции
с международным участием

Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г.

ISBN 978-5-9624-2018-9

Материалы публикуются в авторской редакции
Дизайн обложки Ю. Розиновой, фото Н. Дорофеева

Подписано в печать 24.02.2022. Формат 60×90 1/16
Усл. печ. л. 18,3. Тираж 60 экз. Заказ 16

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИГУ
664082, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124