

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

3-й РОССИЙСКИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНГРЕСС

г. Псков, 26 сен. – 1 окт. 2021 г.

Материалы конгресса

Электронное сетевое издание

Псков
2021

УДК 579
ББК 28.4
Т665

Редколлегия:

Бонч-Осмоловская Е. А., Ильина Н. А., Пименов Н. В.

Составители:

Пименов Н. В., Бонч-Осмоловская Е. А., Ильина Н. А., Антал Т. К.,
Серова О. А., Фролов В. В., Бугеро Н. В.

Т665

3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сен. – 1 окт. 2021 г.): материалы конгресса / редкол.: Бонч-Осмоловская Е. А., Ильина Н. А., Пименов Н. В.; сост.: Пименов Н. В., Бонч-Осмоловская Е. А., Ильина Н. А., Антал Т. К., Серова О. А., Фролов В. В., Бугеро Н. В. – Псков : Псковский государственный университет, 2021. – 296 с. – Режим доступа : <https://lib.pskgu.ru/page/d1f45f6d-f629-4fa1-94fd-6449031c1269>
ISBN 978-5-00200-015-9

В сборнике представлены тезисы устных и постерных сообщений, представленных на 3-ем Российском микробиологическом конгрессе. Цель Конгресса – широкий обмен информацией в области микробиологии и смежных дисциплин. Рассматривается филогенетическое и метаболическое разнообразие микроорганизмов, их распространение, генетические, биохимические и структурно-функциональные особенности, новые методы исследования микроорганизмов, биотехнологические и медицинские разработки. Изучение микробного разнообразия и его ресурсов, микробного метаболизма и его генетических детерминат является основой для генерации новых фундаментальных знаний в области биологии и создания принципиально новых технологий.

УДК 579
ББК 28.4

ISBN 978-5-00200-015-9

© Коллектив авторов, 2021
© Псковский государственный университет, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Разнообразие и экология микроорганизмов

Бархутова Д. Д., Абидуева Е. Ю., Дагурова О. П., Зайцева С. В., Лаврентьева Е. В. 27
Микробные сообщества экстремальных местообитаний внутренней Азии

Заварзина Д. Г. 28
Анаэробный цикл железа в алкалофильных микробных сообществах

Кадников В. В., Марданов А. В., Карначук О. В., Равин Н. В. 29
Микробная «тёмная материя» подземной биосферы

Качалкин А. В., Глушакова А. М., Стрелецкий Р. А., Савченко В. Е., Венжик А. С. 29
Эндофитные дрожжи в плодах сельскохозяйственных культур

Пименов Н. В. 30
Микробные процессы цикла метана в Арктических морях

Потехин А. А. 31
Экологическое разнообразие симбиозов инфузорий с бактериями

Метаболизм и геномика микроорганизмов

Берг И. А. 31
Механизмы автотрофной фиксации CO₂ у термофильных бактерий

Гельфанд М. С. 32
Эволюция бактериальных геномов

Жарков Д. О. 33
Репарация ДНК: за пределами модельных микроорганизмов

Карначук О. В. 33
Ренессанс культивирования в постгеномное время

Кубланов И. В. 34
Разложение полисахаридов растительного происхождения гипертермофильными археями

*Шавкунов К. С., Маркелова Н. Ю., Глазунова О. А., Аликина О. В.,
Киселев С. С., Панюков В. В., Озолинь О. Н. 35*
РНК-секретом бактерий

Микробные технологии включая агrobiотехнологии

Андронов Е. Е., Проворов Н. А. 36
Эволюционные процессы в системах бобово-ризобияльного симбиоза

Дедыш С. Н. 36
Новые рубежи в биотехнологиях, основанных на использовании метанотрофных бактерий

Донова М. В., Стрижов Н. И., Ивашина Т. В., Довбня Д. В., Карпов М. В., Брагин Е. Ю. 37
Актинобактерии рода *Mycolicibacterium* как платформа для создания микробных продуцентов ценных стероидных соединений

Куюкина М. С., Криворучко А. В., Ившина И. Б. 38
Биосурфактанты: структура, механизмы синтеза, функциональная активность

Белецкий А. В., Танащук Т. Н., Кишковская С. А., Шаламитский М. Ю., Равин Н. В.,
Марданов А. В. 39
Исследование штаммов дрожжей, используемых в виноделии, с помощью геномных, транскриптомных и протеомных подходов

Николаев Ю. А., Марданов А. В., Грачев В. А., Берестовская Ю. Ю., Каллистова А. Ю.,
Равин Н. В., Пименов Н. В. 40
Разработка подходов к управлению Анаммокс-сообществом (генетический, метаболический, физиологический и популяционный уровни)

Медицинская микробиология

Ильина Е. Н. 40
Микробиота кишечника человека в здоровье и патологии

Капрельянц А. С. 41
Гипобиоз бактерий: механизмы, медицинские аспекты

Припутневич Т. В., Гордеев А. Б., Любасовская Л. А., Мелкумян А. Р. 42
Медицинская микробиология: вчера, сегодня, завтра

Романова Ю. М. 42
Бактериальные биопленки: роль в хроническом инфекционном процессе и поиск средств борьбы с ними

Суворов А. Н. 43
Современное состояние проблемы коронавирусной инфекции и ее вакцинной профилактики

Тикунова Н. В., Морозов В. В., Тикунов А. Ю., Швалов А. Н., Бардашева А. В.,
Шрайнер Е. В., Морозова В. В., Власов В. В. 44
Подходы к нормализации микробного сообщества при хронических заболеваниях кишечника

СЕКЦИЯ: РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Абрамова Е. С., Попова Н. М., Сафонов А. В. 45
Микробное разнообразие глинистых материалов и его роль в эволюции инженерных барьеров безопасности

Аверина С. Г., Пиневиц А. В. 45
Система цианобактерий: логика и новые горизонты разнообразия

Бегматов Ш. А., Белецкий А. С., Кадников В. В., Марданов А. В., Пименов Н. В.,
Равин Н. В., Саввичев А. С. 46
Микробные сообщества донных осадков и микробные процессы циклов углерода, серы и азота в Баренцевом море

<i>Гаврилов С. Н., Маслов А. А., Ключкина А. А., Меркель А. Ю., Заварзина Д. Г.</i>	47
Минеральные подземные воды как среда обитания и источник выделения новых некультивируемых прокариот и представителей «разреженной биосферы»	
<i>Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н., Бондаренко С. А., Кокаева Л. Ю., Понизовская В. Б., Куварина А. Е., Гаврюшина И. А., Садыкова В. С.</i>	47
Мицелиальные грибы содовых солончаков Кулундинской степи	
<i>Гоголева Н. Е., Балкин А. С., Червяцова О. Я., Бойцова М. Д., Кузьмина Л. Ю., Плотников А. О., Шагимарданова Е. И., Гоголев Ю. В.</i>	48
Структурная и функциональная характеристика микробных сообществ пещеры Шульган-Таш (Башкортостан)	
<i>Евтушенко Л. И., Василенко А. Н., Озерская С. М.</i>	49
MIRRI как общеевропейская система коллекций микроорганизмов	
<i>Журавлева А. С.</i>	50
Термофильные нефтеразлагающие почвенные бактерии антропогенно загрязненных территорий Санкт-Петербурга и Ленинградской области	
<i>Зайцева А. А., Бахарева Д. А., Чеканов К. А., Зайцев П. А., Лобакова Е. С.</i>	51
Микробные сообщества каротиногенных микроводорослей	
<i>Зайчиков В. А., Ким Д., Потехина Н. В., Тульская Е. М., Евтушенко Л. И.</i>	52
Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий родов <i>Curtobacterium</i> , <i>Clavibacter</i> и <i>Rathayibacter</i>	
<i>Иванова Е. А., Гладков Г. М., Кимеклис А. К., Андронов Е. Е., Абакумов Е. В.</i>	53
Структура и разнообразие прокариотных сообществ криоконитов	
<i>Лебедева Е. Г., Паничев А. М., Рысева Ю. Ю.</i>	53
Микробиологический состав горных пород, содержимого внутренних органов диких животных, поедаемых грунты на территории заповедников Приморского края	
<i>Лысак Л. В., Князева А. Н., Лапыгина Е. В., Александрова А. В.</i>	54
Обилие и разнообразие микробных сообществ почв заповедников Вьетнама	
<i>Манучарова Н. А.</i>	55
Разнообразие и биотехнологический потенциал почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузок	
<i>Михайлов И. С., Галачьянц Ю. П., Букин Ю. С., Петрова Д. П., Башенхаева М. В., Сакирко М. В., Титова Л. А., Захарова Ю. Р., Лихошвай Е. В.</i>	56
Синхронная динамика и функциональные особенности бактерий и микроэукариот фотического слоя озера Байкал	
<i>Никитин Д. А.</i>	57
Микробиом почв северной части архипелага Новая Земля	
<i>Павлова О. Н., Черницына С. М., Ломакина А. В., Тупикин А. Е., Земская Т. И., Кабилов М. Р.</i>	58
Термофильные бактерии в психрофильных осадках озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводов	

Пельтек С. Е., Брянская А. В., Шипова А. А., Уварова Ю. Е., Розанов А. С., Старостин К. В., Горячковская Т. Н., Таран О. П., Лазарева Е. В.	59
Изучение микробных сообществ соленых озер Новосибирской области	
Саввичев А. С., Русанов И. И., Кадников В. В.	60
Микробные сообщества и микробные процессы цикла метана в высокоширотных тундровых озерах полуострова Ямал	
Самылина О. С., Намсараев З. Б., Турова Т. П., Сорокин Д. Ю.	61
Фиксация азота фототрофными сообществами содовых озёр Кулундинской степи (Алтайский край, Россия)	
Семенов М. В., Поздняков Л. А., Ксенофонтова Н. А.	61
Генетические показатели почвенного микробиома: насколько они отражают микробиологическую активность почвы?	
Сидорова Д. Е., Падий Д. А., Чурсина М. А., Плюта В. А., Хмель И. А.	62
Микробные летучие органические соединения как инструмент межклеточного взаимодействия	
Слободкина Г. Б., Alliouh M., Меркель А. Ю., Фролова А. А., Alain K., Jebbar M.	63
Слободкин А. И. Термофильные прокариоты, участвующие в цикле серы в морских гидротермах	
Строева А. Р., Ключкина А. А., Ахманов Г. Г., Меркель А. Ю.	64
Микробные сообщества придонной воды и донных отложений Баренцева моря	
Узун М. М., Козяева В. В., Груздев Д. С.	65
Изучение магнитотактических бактерий как путь исследования микробной темной материи	
Щербакова В. А.	65
Современные подходы к систематике метаногенных архей: минимальные стандарты для описания новых таксонов 2.0.	

СЕКЦИЯ: МЕТАБОЛИЗМ И ГЕНОМИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Брюханов А. Л.	67
Системы антиоксидантной защиты в клетках строго анаэробных микроорганизмов	
Бут С. Ю., Егорова С. В.	68
Особенности функционирования серинового цикла у метанотрофов I типа	
Гоголев Ю. В., Гоголева Н. Е., Сайганова М. А., Осипова Е. В., Хамо Х., Балкин А. С.	68
Метатранскриптомное профилирование бактерий в патосистемах и картирование стартов инициации транскрипции	
Заюлина К. С., Малышева А. Д., Кубланов И. В.	70
Выделение и характеристика новых термостабильных гликозидаз гипертермофильной археи <i>Thermofilum adornatum</i> 1910b	
Ключкина А. А., Заюлина К. С., Лаврова В. Д., Фролов Е. Н., Кубланов И. В.	70
Структурно-функциональное исследование каталитического домена GH12 из мультидоменной эндоглюканазы гипертермофильной археи <i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	

<i>Козяева В. В., Узун М. М., Груздев Д. С.</i>	71
Возникновение магнитотактического фенотипа на примере бактерий филумов <i>Nitrospirota</i> и <i>Desulfobacterota</i>	
<i>Кокшарова О., Бутенко И., Побегуц О., Сафронова Н., Говорун В.</i>	72
Регуляторная роль нейротоксичной небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина в метаболизме цианобактерий – протеомный подход	
<i>Кудрякова И. В., Афошин А. С., Ивашина Т. В., Сузина Н. Е., Леонтьевская Е. А., Леонтьевская (Васильева) Н. В.</i>	73
Влияние мутации в гене бактериолитического белка Л5 на формирование внешнемембранных везикул <i>Lysobacter</i> sp. XL1	
<i>Летаров А. В., Бабенко В. В., Куликов Е. Е., Millard А., Летарова М. А., Спасская Н. Н.</i>	74
Экогеномика сообществ бактериофагов, ассоциированных с кишечным микробиомом лошадей	
<i>Минаев Н. В.</i>	74
Лазерная инженерия микробных систем: возможности и результаты	
<i>Парфирова О. И., Горшков В. Ю., Петрова О. Е., Смолочкин А. В., Исламов Б. Р., Гоголева Н. Е., Гоголев Ю. В.</i>	75
Фосфонаты – потенциальные факторы вирулентности пектобактерий	
<i>Петрова М. А., Миндлин С. З.</i>	76
Механизмы, обеспечивающие биологический прогресс представителей рода <i>Acinetobacter</i>	
<i>Петрова О. Е., Парфирова О. И., Горшков В. Ю.</i>	77
Адаптивная пролиферация бактерий – феномен, механизмы регуляции	
<i>Розова О. Н., Екимова Г. А., Решетников А. С., Хмеленина В. Н., Мустахимов И. И.</i>	77
Ферменты альтернативного пути метаболизма глюкозы у облигатных метанотрофов	
<i>Руденко Т., Тарлачков С., Трубицина Л., Грабович М.</i>	78
Новые аспекты метаболизма бесцветных нитчатых серобактерий	
<i>Свиридов А. В., Эпиктетов Д. О., Тарлачков С. В., Шушкова Т. В., Леонтьевский А. А.</i>	79
Микробный метаболизм природных и синтетических органофосфонатов: неизвестная часть глобального круговорота фосфора	
<i>Терёшина В. М., Данилова О. А., Януцевич Е. А., Бондаренко С. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н.</i>	80
Роль осмолитной системы в адаптации микромицетов-экстремофилов	
<i>Трубицина Л. И., Заварзина А. Г., Лисов А. В., Белова О. В., Трубицин И. В., Леонтьевский А. А.</i>	81
Двухдоменные лакказы актинобактерий: распространение, свойства, роль в природных процессах	
<i>Тутукина М. Н., Рыбина А. А., Бессонова Т. А., Казнадзей А. Д., Кондрашов Ф. А., Озолинь О. Н., Гельфанд М. С.</i>	82
Роль метаболических регуляторов в модуляции подвижности и образования биопленок у <i>Escherichia coli</i>	



Филонов А. Е., Пунтус И. Ф., Ахметов Л. И., Филатова И. Ю., Делеган Я. А., Керзь М. А., Титок М. А.	82
Гены, вовлеченные в синтез биопав в штаммах родококков-деструкторов углеводов	
Фролов Е. Н. Мальцева А. И., Черных Н. А., Лебединский А. В., Кубланов И. В.	83
Распространение трансальдозного варианта цикла Кальвина у термофильных прокариот	
Хаова Е. А., Кашеварова Н. М., Сидоров Р. Ю., Ткаченко А. Г.	84
Функции полиаминов в регуляции потенциальных факторов персистенции <i>Escherichia coli</i>	
Чеканов К. А., Соловченко А. Е.	85
Механизмы фотозащиты у каротиногенной микроводоросли <i>Haematococcus lacustris</i> (chlorophyta)	
Шевченко С. А., Назаров П. А.	86
Изучение антибактериальных свойств, проницаемости и механизма действия митохондриально-направленного антиоксиданта MitoQ	
Шиков А. Е., Алагов Р. О., Маловичко Ю. В., Нижников А. А., Антонец К. С.	87
Изучение молекулярных механизмов адаптивной эволюции инсектицидных токсинов CRY бактерии <i>Bacillus thuringiensis</i>	

СЕКЦИЯ: МИКРОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВКЛЮЧАЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЮ

Белоусов М. В., Косолапова А. О., Сулацкая А. И., Белоусова М. Е., Сулацкий М. И., Антонец К. С., Волков К. В., Лыхолай А. Н., Штарк О. Ю., Васильева Е. Н., Жуков В. А., Иванова А. Н., Зыкин П. А., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Тихонович И. А., Нижников А. А.	88
Белки PopA и PopB клубеньковой бактерии <i>Rhizobium leguminosarum</i> обладают амилоидными свойствами	
Бурыгин Г. Л., Каргаполова К. Ю., Ткаченко О. В.	89
Молекулярные основы формирования успешного ассоциативного симбиоза ризобактерий с растениями	
Вантеева А. В., Котова И. Б., Миронов В. В., Меркель А. Ю.	89
Получение удобрения из отходов: микробиологические процессы при компостировании агро-пищевого сырья	
Грачёва Т. А., Бабич Т. Л., Зотова А. Н.	90
Оценка биотехнологического потенциала мицелиальных актинобактерий как биодеструкторов углеводов нефти	
Гурина Е. В., Васильченко А. С.	91
Антимикробный метаболит <i>Aspergillus fumigatus</i> MX59, как основа новых биопестицидов	
Доманская О. В., Васильченко А. С. Яшников А. В.	92
Многофункциональная активность психрофильных штаммов <i>Bacillus</i> sp., выделенных из мерзлых пород Западной Сибири и их потенциал в защите растений	

Карпов М. В., Николаева В. М., Фокина В. В., Шутов А. А., Казанцев А. В., Стрижов Н. И., Донова М. В.	93
Конструирование и функциональный анализ рекомбинантных штаммов <i>Mycolicibacterium smegmatis</i> , несущих гетерологичные гены стероидных монооксигеназ	
Криворучко А. В., Куюкина М. С., Ившина И. Б.	93
Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков	
Купряшина М. А., Пылаев Т. Е., Пономарева Е. Г.	94
Биодеколоризация малахитового зеленого свободными и иммобилизованными клетками азоспирилл	
Кураков А. В., Биланенко Е. Н., Бондаренко С. А., Попова О. В., Тихонов В. В.	95
Микобиота коконов и пищеварительного тракта дождевых червей <i>Eisenia fetida</i> , <i>Dendrobaena veneta</i>	
Лукьянова А. А., Токмакова А. М., Евсеев П. В., Игнатов А. Н., Мирошников К. А.	96
Геномное разнообразие и диагностика бактерий <i>Curtobacterium</i>	
Миндубаев А. З., Бабынин Э. В., Бадеева Е. К., Акосах Й. А.	96
Микробиологическое обезвреживание загрязнений токсичными соединениями фосфора	
Пелевина А. В., Берестовская Ю. Ю., Грачёв В. А., Дорофеева И. К., Сорокин В. В., Дорофеев А. Г., Каллистова А. Ю., Николаев Ю. А., Груздев Е. В., Белецкий А. В., Равин Н. В., Пименов Н. В., Марданов А. В.	97
Фосфат-аккумулирующее микробное сообщество лабораторного реактора типа SBR	
Попова Н. М., Сафонов А. В., Артемьев Г. Д., Вишнякова А. В., Литти Ю. В.	98
Биообрастание анаммокс-бактериями материалов для создания подземного проницаемого барьера для удаления азотных загрязнений	
Сафонов А. В., Попова Н. М., Артемьев Г. Д., Богуславский А. Е.	99
Микробное разнообразие водоносных горизонтов с комплексным загрязнением вблизи урановых шламохранилищ и изменение состава сообществ при биоремедиации	
Сафронова В., Сазанова А., Кузнецова И., Белимов А., Гуро П., Карлов Д., Юзихин О., Чирак Е., Верховина А., Афонин А., Андронов Е., Тихонович И.	100
Использование ризобияльных штаммов, выделенных из реликтовых симбиотических систем для повышения эффективности симбиоза у традиционных бобовых культур	
Соколова Д. Ш., Семёнова Е. М., Бабич Т. Л., Груздев Д. С., Биджиева С. Х., Ершов А. П., Жапаров Н. С., Назина Т. Н.	101
Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов в нефтяном месторождении Узень (казахстан) как основа для создания биотехнологии увеличения нефтеизвлечения	
Соловченко А. Е., Горелова О. А., Селях И. О., Баулина О. И., Семенова Л. Р., Щербаков П. Н., Зайцев П. А., Лукьянов А. А., Лобакова Е. С.	102
Избыточное поглощение фосфора клетками микроводорослей	
Степанов А. Л., Козлова Е. А., Лысак Л. В.	102
Бактогумусовые препараты как основа природоподобных технологий ремедиации почв и их производных	

Стойнова Н. В., Машко С., Крылов А., Лобанова Ю., Горшкова Н., Игонина О., Малых Е., Сычева Е., Ублинская А., Гук К., Самсонов В.	103
Современные принципы геномного редактирования в создании бактериальных продуцентов аминокислот и их производных	
Турковская О. В., Дубровская Е. В., Муратова А. Ю., Позднякова Н. Н., Голубев С. Н., Бондаренкова А. Д.	104
Влияние микроорганизмов-интродуцентов на растения в процессе фиторемедиации	
Цыганков А. А., Стародубов А. С., Зорин Н. А.	104
Водородный электрод на основе HydSL гидрогеназы из <i>Thiocapsa bogorovii</i> в топливном эlemente с высокой плотностью тока	

СЕКЦИЯ: МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Абдулкадиева М. М., Сысолятина Е. В., Васильева Е. В., Слонова Д. А., Домнин П. А., Станишевский Я. М., Ермолаева С. А.	106
Паттерны приповерхностного движения и адгезия вирулентных и сапрофитических <i>E.coli</i>	
Альховский С. В., Леншин С. В., Ромашин А. В., Вышемирский О. И., Вишневская Т. В., Булычева Ю. И., Львов Д. К., Гительман А. К.	107
Экология и генетика SARS-подобных коронавирусов, циркулирующих на территории России	
Беловежец Л. А., Кондрашов Е. В., Шатохина Н. С.	108
Антимикробный потенциал новых водорастворимых производных изоксазола	
Беспярых Ю. А., Басманов Д. В., Шитиков Е. А.	109
Омиксная эра: новый взгляд на вирулентность возбудителя туберкулеза и способы борьбы с инфекцией	
Воронина О. Л., Рыжова Н. Н., Аксенова Е. И., Кутузова А. В., Кунда М. С., Лазарева А. В., Жилина С. В., Краева Л. А., Гинцбург А. Л.	109
Разнообразие буркхолдерий, инфицирующих больных муковисцидозом, в условиях ограничения распространения эпидемического штамма	
Ганнесен А. В., Мартьянов С. В., Овчарова М. А., Данилова Н. Д., Дювенжи Е. В., Киселева А. А., Журина М. В., Бочкова Е. А., Плакунов В. К.	110
Действие гормонов на моновидовые и мультивидовые биопленки микроорганизмов- комменсалов кожи человека	
Дбар С. Д.	111
Нейромедиаторная активность штаммов <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	
Демьянкова М. В., Габриэлян Н. И., Кубанова М. Х., Кормилицина В. Г., Шарапченко С. О., Глухова А. А., Ефименко Т. А., Бойкова Ю. В., Васильева Б. Ф., Малкина Н. Д., Иванкова Т. Д., Терехова Л. П., Садыкова В. С., Ефременкова О. В.	112
Способ отбора продуцентов антибиотиков, преодолевающих множественную лекарственную устойчивость патогенов	
Ефименко Т. А., Карабанова А. А., Демьянкова М. В., Якушев А. В., Глухова А. А., Габриэлян Н. И., Ефременкова О. В.	113
Антибиотическая активность актинобактерий, выделенных из кишечника диплопод, в отношении клинических изолятов <i>Klebsiella pneumoniae</i>	

Зацаринная Е. А., Лунькова Е. С., Трунякова А. С., Колупаева Н. В., Колупаева Л. В., Гаськова А. С., Куцкир В. Д.	113
Антибиотикоустойчивость энтеробактерий, выделенных из поверхностных водных объектов г. Рязани	
Калинин Е. В., Чаленко Я. М., Станишевский Я. М., Ермолаева С. А.	114
Детекция <i>Listeria monocytogenes</i> методом дот-блота с использованием антител против поверхностного белка Интерналина В.	
Каюмов А. Р., Тризна Е. Ю., Миронова А. В., Федорова М. С., Каримова А. В.	115
Новые подходы к терапии смешанных инфекций	
Орлов Ю. Л., Лузин А. Н., Дергилев А. И., Юнусов В. В., Обозина А. С.	116
Оценки энтропии при анализе структуры вирусных геномов на примере SARS-COV-2	
Садеева З. З., Комягина Т. М., Алябьева Н. М., Новикова И. Е., Шакирзянова Р. А., Лазарева А. В., Вершинина М. Г.	116
Эпидемиология и молекулярно-генетическая характеристика <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i> , выделенных из крови и ликвора у детей	
Сидоров Р. Ю., Ахова А. В., Кашеварова Н. М., Ткаченко А. Г.	117
Синтетический аналог природного соединения эрогоргиаена является ингибитором алармон синтетаз и подавляет персистенцию микобактерий	
Слонова Д. А., Посвятенко А. В., Сысолятина Е. В., Ермолаева С. А., Кибардин А. В., Лысюк Е. Ю., Северинов К. В., Ларин С. С.	118
Пептидогликан-распознающий белок TAG-7/PGLYRP1 – ингибитор внутриклеточной выживаемости патогенов	
Степаненко И. С., Ямашкин С. А.	119
Производные замещенных бензаминоиндоллов – новая группа соединений с противомикробной активностью	
Стоянова Л. Г.	119
Метабиотики на основе пробиотических штаммов молочнокислых бактерий и их перспективность	
Триандафилова Г. А. Смирнова Г. В., Тюленев А. В., Октябрьский О. Н.	120
Влияние оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на бактерии <i>Escherichia coli</i>	
Уштанит А. И., Михайлова Ю. Д., Перетокина И. В., Крылова Л. Ю., Макарова М. В., Сафонова С. Г., Борисов С. Е., Зименков Д. В.	121
Проблемы определения резистентности микобактерий туберкулёза к бедаквилину и линезолиду	
Цыганов И. В., Сидоров Р. Ю., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г.	122
Синтетический аналог метаболита морских кораллов подавляет образование биопленок микобактериями	
Шадрин А. М., Копосова О. Н., Скорынина А. В., Бузиков Р. М., Казанцева О. А., Пилигримова Э. Г., Кулябин В. А., Рябова Н. А., Хлопова К. В., Тимофеев В. С.	123
Бактериофаги и их ферменты как антибактериальные агенты	

Шаскольский Б. Л., Кандинов И. Д., Кравцов Д. В., Горшкова С. А., Винокурова А. С., Дементьева Е. И., Грядунов Д. А. 123
Полногеномный анализ *Neisseria gonorrhoeae*: генетическое разнообразие и устойчивость к антимикробным препаратам

Шлеева М. О., Савицкий А. П., Линге И. А., Апт А. С., Капрельянц А. С. 124
Фотодинамическая инактивация микобактерий

СЕКЦИЯ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ЭКОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ

Александров А. И., Гросфельд Э. В., Бидюк В. А., Кухтевич И. В., Митькевич О. В., Дмитриев С. Е., Гладышев В. Н., Александров А. И., Гросфельд Э. В., Бидюк В. А., Кухтевич И. В., Митькевич О. В., Дмитриев С. Е., Гладышев В. Н. 126
Полногеномный поиск мутантов дрожжей с увеличенной вероятностью некроза – исследование нового типа клеточной гибели

Барбитов Ю. А., Максютенко Е. М., Москаленко С. Е., Матвеев А. Г., Журавлева Г. А. ... 127
Амплификация гена как способ адаптации дрожжей к нонсенс-мутациям в генах факторов терминации трансляции

Валиахметов А. Я., Звонарев А. Н., Сузина Н. Е. 127
Регуляция первичного некроза в дрожжах *S. cerevisiae* внеклеточным рН.

Давлетшин А. И., Спасская Д. С., Тютяева В. В., Гарбуз Д. Г., Карпов Д. С. 128
Получение новых SruCas9 нуклеаз с повышенной специфичностью редактирования ДНК в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Жгун А. А., Думина М. В., Валиахметов А. Я., Эльдаров М. А. 129
H⁺-АТФаза плазматической мембраны из *Saccharomyces cerevisiae* как инструмент для изучения биосинтеза вторичных метаболитов в грибах

Калебина Т. С., Рекстина В. В., Горковский А. А., Кудряшова И. Б. 130
Роль глюкан-ремоделирующего белка BGL2P в молекулярной организации клеточной стенки дрожжей

Каменский П. А., Чичерин И. В., Левицкий С. А., Балева М. В. 131
Удивительные приключения третьего фактора инициации трансляции в митохондриях дрожжей

Карпов Д. С., Спасская Д. С., Тютяева В. В., Карпов В. Л. 131
Механизмы устойчивости дрожжей к стрессовым условиям с участием протеасомы и ее главного транскрипционного регулятора Rpn4

Лапашина А. С., Кашко Н. Д., Зубарева В. М., Галкина К. В., Маркова О. В., Кнорре Д. А., Фенюк Б. А. 132
Замена βQ263L в АТФ-синтазе дрожжей ослабляет АДФ-ингибирование аТФазной активности фермента и улучшает рост клеток без митохондриальной ДНК

Лютова Л. В., Наумов Г. И., Наумова Е. С. 133
Внутривидовое разнообразие молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции

Рогов А. Г., Голева Т. Н., Епремян Х. Х., Киреев И. И., Звягильская Р. А.	134
Распространение окислительного стресса в клетках дрожжей	
Соколов С. С., Галкина К. В., Северин Ф. Ф., Кнорре Д. А.	134
Роль транспорта стерина в защите от стресса дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

ПОСТЕРНАЯ СЕССИЯ

Абашина Т. Н., Шорохова А. П., Соболева О. И., Мачулин А. В., Поливцева В. Н., Сузина Н. Е.	136
Ультраструктурные особенности механизма антагонистического взаимодействия бактерии-хищника <i>Lysobacter</i> sp. LBL с бактериями-жертвами по типу «wolf park» («волчья стая»).	
Абрамова Т. Н., Позднякова-Филатова И. Ю.	136
Сравнение генов некодирующих РНК PrrF у псевдомонад	
Адельгареева А. Ю., Маркушева Т. В.	137
Сравнительное исследование резистоста микроорганизмов техногенных экотопов	
Александрова Е. А., Синетова М. А., Миронов К. С.	138
Сравнение экофизиологических и генетических характеристик штаммов рода <i>Cyanobacterium</i>	
Андреева Н. И., Дементьев Д. А., Юзбашева Е. Ю.	138
Применение CRISPR-Cas9 системы редактирования генома для усиления синтеза ацетил-СоА и малонил-СоА в дрожжах <i>Yarrowia lipolytica</i>	
Андреева Н. А.	139
Цианобактерии эпиплтона прибрежной зоны бухты карантинная (Черное море, Севастополь)	
Антонова Д. А., Ничипоренко А. С., Усатых А. А., Якунина М. В.	140
Перераспределение ДНК бактерии <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в клетке во время инфекции бактериофагом phiKZ	
Артемов Г. Д., Сафонов А. В., Попова Н. М.	141
Биогеохимический барьер в верхних водоносных горизонтах ОАО «ЧМЗ» с урановым загрязнением	
Афошин А. С., Кудрякова И. В., Тарлачков С. В., Леонтьевская (Васильева) Н. В.	142
Транскриптомный подход для поиска литических агентов <i>Lysobacter capsici</i> ВКМ В-2533 [†]	
Багаева Д. И., Демина Г. Р., Никитушкин В. Д., Вострокнута Г. Н., Шлеева М. О., Капрельянц А. С.	142
Синергическое действие гидролаз RpfB и RipA стимулирует реактивацию «некультивируемых» покоящихся форм <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	
Байдамшина Д. Р., Рафия Наср А., Комаревцев С. К., Осмоловский А. А., Каюмов А. Р. ...	142
Новая сериновая протеиназа рарс из <i>Aspergillus ochraceus</i> ВКМ-F4104D для разрушения биопленок, образованных клетками <i>Staphylococcus aureus</i>	
Барашкова А. С., Рогожин Е. А., Прокофьева М. И., Чердынцева Т. А., Шегина Е. С., Ратникова Н. М., Гаврилов С. Н.	144
Выделение антимикробных соединений, продуцируемых гипертермофильной археей рода <i>Thermococcus</i>	

Башенхаева М. В., Елецкая Е. В., Томберг И. В., Марченков А. М., Галачьянц Ю. П.	145
Свободноживущие и прикрепленные к частицам бактериальные сообщества озера Байкал в районах с разным гидрологическим режимом	
Белалов И., Павлова Е., Морозов А., Дэвид Паэс-Эспино	145
Степенной закон распределения CRISPR-CAS систем	
Белова С. Э., Данилова О. В., Дедыш С. Н.	146
Доминирование метанотрофов группы USC α в метанооксиляющих сообществах лесотундры Ямала	
Берестовская Ю. Ю., Васильева Л. В.	147
Психрофильный представитель рода <i>Cryobacterium</i>	
Бесараб Н. В., Летарова М. А., Голомидова А. К., Куликов Е. Е., Лагоненко А. Л., Евтушенков А. Н., Летаров А. В.	147
Метастабильные ассоциации бактериофагов и бактерии <i>Erwinia amylovora</i>	
Бессонова Т. А., Рыбина А. А., Дахновец А. И., Гарущянц С. К., Озолин О. Н., Тутукина М. Н., Гельфанд М. С.	148
Альтернативные формы факторов транскрипции у <i>Escherichia coli</i>	
Бидюк В. А., Александров А. И.	149
Изучение механизмов клеточной гибели в ответ на инактивацию жизненно важных генов в состоянии покоя	
Благовещенская Е. Ю., Царелунга А. А.	150
Микобиота филлопланы растений в сравнении с грибами, присутствующими в почве и в воздухе	
Богданов К. И., Плакунов В. К., Ганнесен А. В., Мартьянов С. В., Журина М. В.	150
Анализ и реконструкция мультивидовых микробных биопленок, формируемых на поверхности полиэтилена	
Богун А. Г., Благодатских С. А., Козлов А. И., Сизова А. А., Дубицкий К. А., Козлов Н. А., Съедин Д. Ю., Кошелева У. А., Петрухин Д. Д., Воробьев А. Н., Стариков П. П., Дятлов И. А.	151
Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов – современная информационная система для учёта коллекционных штаммов и анализа их геномов	
Болтянская Ю. В., Кевбрин В. В., Пименов Н. В.	152
Протеолитический путь в микробном сообществе содовых озер	
Боровкова А. Н., Наумов Г. И., Наумова Е. С.	153
Генетическое родство важных для биотехнологии дрожжей <i>Saccharomyces eubayanus</i> , <i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> и <i>S. bayanus</i> var. <i>ivarum</i>	
Брянцева И. А., Груздев Д. С., Горленко В. М.	154
Новая мезофильная нитчатая аноксигенная фототрофная бактерия из монголии	
Бугеро Н. В., Ильина Н. А.	154
Некоторые особенности персистенции простейших <i>Blastocystis</i> spp.	
Бузиков Р. М., Филиппчук Т. А., Валентович Л. Н., Коломиец Э. И., Шадрин А. М.	156
Полногеномное секвенирование штамма <i>Pseudomonas syringae</i> БИМ В-268, патогена сельскохозяйственных культур	
Васильева Л. В., Пименов Н. В.	156
Новая простекобактерия <i>Prosthecodimorpha staleyi</i>	

- Веденева Н. В., Тихомирова Е. И., Скиданов Е. В., Матвеев Ю. А. 157
Идентификация микроорганизмов, вызывающих биообрастание и вторичное бактериальное загрязнение систем замкнутого водоснабжения гальванических производств
- Виноградова Е. Н., Карпова О. В., Лобакова Е. С. 158
Анализ генов родопсинов ионных каналов в коллекционных штаммах и природных изолятах водорослей *Chlorophyta* и *Cryptophyta*
- Волченко Н. Н., Лазукин А. А., Масленников С. И., Самков А. А., Худокормов А. А. 159
Биоэлектрическая активность донных микробных топливных элементов в полевом круглогодичном эксперименте в условиях Японского моря
- Воронина О. Л., Кунда М. С., Аксенова Е. И., Рыжова Е. И., Романенко Л. А., Новикова О. Д. 160
Механизмы поддержания гомеостаза клетки психротолерантными бактериями *Marinomonas primoryensis* и *Yersinia ruckeri* в условиях морской акватории
- Гаврилов С. Н., Маслов А. А., Ключкина А. А., Меркель А. Ю., Заварзина Д. Г. 161
Минеральные подземные воды как среда обитания и источник выделения новых некультивируемых прокариот и представителей «разреженной биосферы»
- Гаврилова Е. А., Анисимова Е. А., Каюмов А. Р. 161
Новые штаммы *Lactobacillus* с антагонистическим потенциалом
- Галкина К. В., Маркова О. В., Кашко Н. Д., Зубарева В. М., Лапашина А. С., Фенюк Б. А., Кнорре Д. А. 162
Физиологическая роль ингибиторов F_0F_1 -АТФ-синтазы INH1 И STF1 в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
- Гасюк О. А., Волченко Н. Н., Лазукин А. А., Самков А. А., Худокормов А. А., Шаталина Е. С. 163
Устойчивость микроорганизма *Shewanella oneidensis* MR-1 к некоторым тяжелым металлам
- Глинская Е. В., Дементьева Н. А., Петерсон А. М., Нечаева О. В., Успанова Д. М. 164
Оценка токсического действия нефти на почвенные микроорганизмы
- Гололобова А. В., Лебединский А. В., Ельченинов А. Г., Кубланов И. В., Фролов Е. Н. 165
Первая облигатно автотрофная ацетогенная бактерия *Aceticella autotrophica*
- Горелова О. А., Баулина О. И., Семенова Л. Р., Селях И. О., Лобакова Е. С. 165
Ультраструктурные аномалии гетероцист *Nostoc* sp. PCC 7120 при колебаниях содержания фосфора в среде обитания
- Горелова О. А., Селях И. О., Семенова Л. Р., Щербаков П. Н., Чивкунова О. Б., Баулина О. И., Соловченко А. Е., Лобакова Е. С. 166
Физиологический ответ на дефицит фосфора двух близкородственных цианобактерий в недиазотрофных условиях
- Груздев Е. В., Белецкий А. В., Пелевина А. В., Дорофеев А. Г., Грачев В. А., Пименов Н. В., Равин Н. В., Марданов А. В. 167
Новые фосфат-аккумулирующие микроорганизмы, выявленные в результате метагеномного анализа микробного сообщества лабораторного биореактора, осуществляющего удаление фосфора
- Гhazi Ореиф Эслам Ш., Станишевский Я. М., Макаров В. А., Александров А. И. 168
Анализ противогрибковой активности новых оригинальных веществ в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* для дальнейшего применения методов массового скрининга мутантов и анализа протеомных изменений

Давлетшин А. И., Спасская Д. С., Тютяева В. В., Гарбуз Д. Г., Карпов Д. С.	169
Получение новых SruCas9 нуклеаз с повышенной специфичностью редактирования ДНК в дрожжах <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Данилова О. А., Козлова М. В., Януцевич Е. А., Камзолкина О. В., Терёшина В. М.	169
Липидный и осмолитный профиль алкалофильного микромицета <i>Sodiomyces alkalinus</i> в процессе цитодифференцировки	
Дедыш С. Н.	170
Новые рубежи в биотехнологиях, основанных на использовании метанотрофных бактерий	
Домнин П. А., Архипова А. Ю., Петров С. В., Сысолятина Е. В., Каралкин П. А., Мухачев А. Я., Гусаров А. И., Мойсенович А. М., Лобакова Е. С., Хесуани Ю. Д., Ермолаева С. А.	171
Новая модель не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов, основанная на явлении магнитной левитации	
Дудун А. А., Акулина Л. А., Жуйков В. А., Махина Т. К., Воинова В. В., Бонарцев А. П., Бонарцева Г. А.	172
Конкурентный биосинтез альгината и поли-3-оксибутирата бактериальным штаммом <i>Azotobacter vinelandii</i> 12 для применения в тканевой инженерии	
Дымова А. А., Шеф К. А., Дешевая Е. А., Харин С. А., Гуридов А. А., Поддубко С. В.	174
Микробиологическая характеристика среды обитания Международной космической станции	
Дятлова Е. А., Жарков Д. О.	175
Урацил-ДНК-гликозилаза ортопоксвирусов как мишень для противовирусной терапии	
Ельченинов А. Г., Угольков Я. А., Тоцаков С. В., Сорокин Д. Ю., Кубланов И. В.	176
Геномика галофильных архей-целлюлозолитков	
Ендуткин А. В., Жарков Д. О.	176
Характеристика GO-системы <i>Staphylococcus aureus</i> как потенциальной мишени для комбинированной антибиотикотерапии	
Еремина Н. С., Стойнова Н. В., Ямпольская Т. А.	177
Положительное влияние мутантной аденилатциклазы (CyaA ^{K432Q}) на рост <i>E. coli</i> на этаноле	
Еромасова Н., Журавлёва А., Суханов А., Спирина Е., Ривкина Е.	178
Потенциальный отклик древних микроорганизмов вечной мерзлоты на возможные процессы потепления	
Жаркова Е. К., Ванькова А. А., Дренова Н. В.	179
Микробные сообщества, ассоциированные с фитосферой тимьяна обыкновенного (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	
Жгун А. А., Думина М. В., Покровская М. В., Александрова С. С., Жданов Д. Д., Соколов Н. Н., Эльдаров М. А.	179
Сравнительная активность новых рекоминантных L-аспарагиназ экстремофилов	
Жгун А. А., Нураева Г. К., Думина М. В., Авданина Д. А., Карпова Н. В., Потапов М. П., Хомутов М. А., Январев Д. В., Хомутов А. Р.	180
Взаимосвязь между метаболизмом полиаминов и продукцией вторичных метаболитов у мицелиальных грибов	

Жгун А. А., Потапов М. П., Кардонский Д. А., Карпова Н. В., Ядерец В. В., Стыценко Т. С., Нураева Г. К., Авданина Д. А.	181
Биотрансформация предшественников синтеза биологически активных стероидов грибами-деструкторами темперной живописи	
Жгун Е. С., Кислун Ю. В., Тихонова П. О., Федоров Д. Е., Калачнюк Т. Н., Ильина Е. Н.	182
Влияние трансплантации фекальной микробиоты на метаболические и микробиомные профили пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника	
Zhenavchuk O. F., Beletskii A. V., Mardanov A. V., Mikheeva L. E.	182
The study of genomic polymorphism in closely related strains of cyanobacteria <i>Anabaena variabilis</i>	
Журавлева Д. Э., Исхакова З. И., Каюмов А. Р.	183
GLnR-регулон <i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	
Зайцев П. А., Зайцева А. А., Васильева С. Г., Осипова А. А., Федоренко Т. А., Лобакова Е. С., Соловченко А. Е.	184
Сравнительный анализ циано-микроводорослевых сообществ из загрязненных фосфором южных и северных местообитаний	
Зайцева Ю. В., Ткаченко Д. Н., Хмель И. А.	185
Влияние Quorum Sensing системы на формирование биопленок у <i>Serratia proteamaculans</i> 94	
Захаренко А. С., Иванов В. Г., Земская Т. И.	185
Разнообразие метаноксиляющих бактерий озера Байкал и его притоков	
Захарычева А. П., Хижняк Т. В., Ельченинов А. Г.	186
Новые экстремально гало(алкало)фильные гидротолитические эвриархеи гиперсоленых озер	
Зиньковская И., Чепой Л., Рудь Л., Кирияк Т., Джур С.	187
Влияние наночастиц серебра и золота на биомассу <i>Spirulina platensis</i> при ее росте в закрытой системе	
Злобин И. В., Соколов М. Н., Зайцева Ю. В.	187
Скрининг штаммов бактерий, обладающих лактоназной активностью	
Зубарева В. М., Лапашина А. С., Третьяков Д. О., Фенюк Б. А.	188
Исследование регуляции атфазной активности FOF1-АТФ-синтазы <i>Bacillus subtilis</i>	
Иванова Е. В., Позднякова-Филатова И. Ю., Петриков К. В. и Ветрова А. А.	189
Поиск не кодирующих РНК, участвующих в регуляции метаболизма азота, в геноме <i>Pseudomonas putida</i> BS3701	
Ивасенко Д. А., Перченко Р. В., Рыбкин Д. С., Герасимчук А. Л., Франк Ю. А.	190
Разработка консорциума термофильных и термотолерантных микроорганизмов для компостирования органических отходов	
Игнатенко А. В., Хижняк Т. В.	190
Восстановление хроматов в щелочных аэробных и анаэробных условиях бактериями <i>Halomonas</i> sp. (штамм Mono)	
Измалкова Т. Ю., Сазонова О. И., Соколов С. Л., Кошелева И. А.	191
Плазмиды резистентности к антибиотикам у бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	
Исхакова З. И., Журавлева Д. Э., Черемушкина В. А., Каюмов А. Р.	192
Условия максимальной экспрессии нового представителя PII белков в клетках <i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	

Казанцева О. А., Пилигримова Э. Г., Шадрин А. М.	192
Sam46 и Sam112, бактериофаги нового рода «Samaravirus» с необычной доменной структурой малой субъединицы терминазы	
Каллистова А. Ю., Николаев Ю. А., Грачев В. А., Белецкий А. В., Груздев Е. В., Кадников В. В., Дорофеев А. Г., Равин Н. В., Марданов А. В., Пименов Н. В.	193
Влияние формиата и фолата на активность и состав анаммокс-сообщества	
Калмыкова Г. В., Акулова Н. И., Соколова Э. С., Андреева И. В.	194
Гетерогенность популяции – основной фактор снижения инсектицидности штаммов <i>Bacillus thuringiensis</i>	
Канапина А. Ш., Марченков В. В., Сурин А. К., Ивашина Т. В.	195
Гликозилгидролаза pssW <i>Rhizobium leguminosarum</i> деполимеризует кислый высокомолекулярный экзополисахарид до низкомолекулярных форм	
Карасева Э. В., Моисеева Е., Волченко Н. Н., Самков А. А., Вотчель Д., удокормов А. А.	195
Поиск технологически перспективных штаммов бактерий для целей экологической микробиологии	
Карпова Д. В., Карасева Э. В., Белкина Д. Д., Арзамазова К. А., Худокормов А. А., Юрченко Е. Г.	196
Бактериальные эндофиты винограда, культивируемого в Краснодарском крае	
Карпова О. В., Виноградова Е. Н., Селях И. О., Семенова Л. Р., Горелова О. А., Соловченко А. Е., Лобакова Е. С.	197
Дифференциальная экспрессия генов Рi-транспортеров pstS1 и pstS2 у азотфиксирующей цианобактерии <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	
Катаев В. Я., Гоголева Н. Е., Балкин А. С., Плотников А. О., Черкасов С. В., Гоголев Ю. В. .	198
Транскриптомный анализ <i>Salmonella enterica</i> в условиях голодания при различной лотности популяции	
Кашко Н. Д., Кнорре Д. А.	199
Генетические детерминанты супрессивного фенотипа дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Киреева Н. А., Соколов С. С., Смирнова Е. А., Галкина К. В., Северин Ф. Ф., Кнорре Д. А.	199
Гетерогенность чувствительности клеток в популяции дрожжей повышает их резистентность к природным макролидным антимикотикам	
Кнорре Д. А., Галкина К. В.	200
Механизм защиты дрожжей от ксенобиотиков, основанный на работе ABC-переносчиков: внутренние ограничения и регуляция	
Кокшарова О. А., Монахова М. А.	200
Микробиота <i>Apis mellifera</i> как система иммунитета	
Коллеров В. В., Тарлачков С. В., Шутов А. А., Донова М. В.	201
Разработка подходов к повышению селективности гидроксирования стероидов микромицетом <i>Drechslera</i> sp. Ph F-34	
Колотилова Н. Н.	201
Значимые юбилеи 2022 года в истории микробиологии: 200-лет со дня рождения Л. Пастера и Л. С. Ценковского	
Комаревцев С. К., Осмоловский А. А., Шабунин С. В., Мирошников К. А.	202
Получение и исследование рекомбинантной формы антикоагулянтной протеазы-активатора протеина с плазмы крови, продуцируемой микромицетом <i>Aspergillus ochraceus</i> ВКМ-F4104D	

Кондратьева Д. А., Капрельянц А. С., Демина Г. Р., Шлеева М. О.	203
Продукция нового антимикобактериального соединения культурой <i>Bacillus licheniformis</i> и его эффективность против <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Копосова О. Н., Скорынина А. В., Шадрин А. М.	204
Эндолизины бактериофагов, заражающих бактерии группы <i>Bacillus cereus</i>	
Корнейкова М. В., Никитин Д. А.	205
Численность копий рибосомальных генов и биомасса микроорганизмов баренцевоморского побережья Кольского полуострова	
Косихина Ю. М., Таратынова М. О., Юзбашева Е. Ю.	206
Изучение делеционных мутантов по генам митохондриальных транспортеров лимонной и изолимонной кислот дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i>	
Кочаровская Ю. Н., Делеган Я. А., Соляникова И. П.	207
Сезонная зависимость таксономического состава и структуры микробных сообществ	
Кочаровская Ю. Н., Делеган Я. А., Минкина Т. М., Дудникова Т. С., Сушкова С. Н.	207
Shotgun-метагеномный анализ микробных сообществ	
Криворучко А. В., Куюкина М. С., Ившина И. Б.	208
Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков	
Крупская М. Н., Богдан В. И., Иванов П. А., Летаров А. В.	209
Исследование молекулярных механизмов температурной чувствительности бактериофага ϕ Vp-AMP1	
Кручинин И. В., Яковенко Л. В.	210
Роль кальция в агрегации <i>Dictyostelium discoideum</i>	
Крючкова Е. В., Бурыгин Г. Л., Гоголева Н. Е., Гоголев Ю. В., Турковская О. В.	211
Катаболический потенциал ризосферных бактерий-деструкторов поллютантов	
Кудинова А. Г., Петрова М. А.	211
Динамика численности и таксономическое разнообразие фильтрующихся форм бактерий в ходе сукцессии в почвах Антарктиды (оазис Бангера)	
Кузнецов А. С., Ефимов А. Д., Бойко К. М., Голомидова А. К., Куликов Е. Е., Летаров А. В.	212
Распознавание клетки-хозяина бактериофагом 24В	
Куликов Е. Е., Голомидова А. К., Ефимов А. Д., Кузнецов А. С., Летаров А. В.	213
Лизогенизация штаммов <i>Escherichia coli</i> , не относящихся к серотипу O157, stx-конвертирующим бактериофагом ϕ i24В связана с потерей O-антигена и снижением приспособленности.	
Кулябин В. А., Шадрин А. М.	214
Транскрипционный аппарат бактериофага B83 (vB_VtS_B83)	
Кураков А. В., Барков А. В., Кулачкова С. А., Шнырева А. В., Кожевникова Е. Ю., Кондратьева Е. Г., Терехова В. С., Садыкова В. С.	214
Отбор штаммов грибов для разработки кормовых добавок путем твердофазного культивирования на органических отходах	
Кураков А. В., Федорова М. Д.	215
Микобиота донных грунтов озера Байкал	
Ладанова М. А., Новикова О. Б.	216
Биоразнообразие микрофлоры, выделяемой при мастите коров	

Лапашина А. С., Кашко Н. Д., Зубарева В. М., Галкина К. В., Маркова О. В., Кнорре Д. А., Фенюк Б.	217
Замена β q2631 в АТФ-синтазе дрожжей ослабляет АДФ-ингибирование аТФазной активности фермента и улучшает рост клеток без митохондриальной ДНК	
Лебедева Е. Г., Паничев А. М., Рысева Ю. Ю.	217
Микробиологический состав горных пород, содержимого внутренних органов диких животных, поедаемых грунты на территории заповедников Приморского края	
Леняшина М. О., Максютенко Е. М., Москаленко С. Е., Барбитов Ю. А., Журавлева Г. А.	218
Количественный анализ митохондриальной ДНК у нонсенс-мутантов <i>sup45</i> и <i>sup35</i> дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Летарова М. А., Меньшикова Т. М., Фрумкина С. К. Марулева А. А. Летаров А. В.	219
Переживаемые ассоциации бактериофага <i>phKp2</i> и <i>Klebsiella pneumonia</i>	
Липскеров Ф. А., Ершова Н. М., Шешукова Е. В., Комарова Т. В.	220
Способы усовершенствования агробиотехнологического подхода с целью повышения вирусной репродукции для накопления рекомбинантных белков в растении	
Литвин А. В., Шошинова М. С., Лапашина А. С., Фенюк Б. А.	221
Биоинформатический анализ прокариотических роторных АТФ-синтаз	
Лукина А. П., Панова И. А., Карначук О. В.	221
Культивирование сахаролитических термофильных аэробов из подземных глубинных горизонтов Западно-Сибирского артезианского бассейна	
Лыков И. Н., Галемина И. Е., Зайцева Н. С., Капинус Я. А.	222
Лекарственная устойчивость бактерий, выделенных от домашних животных и их владельцев	
Майкова А. С.	225
Роль системы CRISPR-Cas при образовании биопленок и адаптации к стрессам у патогенной бактерии <i>Clostridioides difficile</i>	
Максимова Ю. Г., Быкова Я. Е., Зорина А. С., Максимов А. Ю.	226
Влияние многостенных углеродных нанотрубок на биопленкообразование бактерий различных систематических групп	
Маланичева И. А.	226
Георгий Францевич Гаузе (1910–1986) — эволюционист, эколог, создатель антибиотиков (к 110-летию учёного)	
Мальшева В. С., Степаненко И. С., Аксенова С. В.	227
Исследование этиологии конъюнктивитов и антибиотикочувствительности, выделенных микробных патогенов	
Мальцева А. И., Лебединский А. В., Кубланов И. В., Фролов Е. Н.	228
Первый автотрофный представитель рода <i>Thermodesulfobivrio</i>	
Марков Н. Д., Смольяков Д. Д., Ключева В. А., Грабович М. Ю.	229
Метилотрофия у представителей рода <i>Sphaerotilus</i>	
Мелконян К. К., Табачникова А. А., Супрун И. В., Волченко Н. Н.	229
Влияние внесения <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 на биоэлектрогенез почвенного микробного топливного элемента	
Мельникова А. А., Комова А. В., Kuchendorf С., Дмитриева Е. Д., Намсараев З. Б.	230
AlgalTextile — новый биогибридный материал для биологической очистки сточных вод	

Мельникова Е. А., Елкина Ю. А., Меламуд В. С., Булаева Г.	231
Биовыщелачивание теннантита и энэргита умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами	
Миронова А. В., Тризна Е. Ю., Каюмов А. Р.	231
Действие внеклеточных метаболитов <i>Staphylococcus aureus</i> в отношении биопленок <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Митькевич О. В., Кулакова М. В., Агафонов М. О.	232
Фосфоманнозилирование секретируемых белков у дрожжей <i>Ogataea parapolymorpha</i> зависит от продуктов генов <i>MNN2</i> и <i>ABV1</i>	
Михайличенко А. С., Матвеевко А. Г., Журавлева Г. А.	233
Влияние мутаций генов фактора элонгации трансляции eEF1A на нонсенс-супрессию	
Моисеева Е. В., Худокормов А. А., Самков А. А., Волченко Н. Н., Круглова М. Н., Ревенко Н. М., Вотчель Д. Р., Карасева Э. В.	233
Поиск перспективных штаммов липолитиков в почве и липидсодержащих отходах города Краснодара	
Моисеенко К. В., Савинова О. С., Глазунова О. А., Фёдорова Т. В.	234
Сравнение профиля секретируемых ферментов первичного ксилотрофа <i>Trametes hirsuta</i> и вторичного ксилотрофа <i>Peniophora lycii</i> при росте на различной древесине	
Мошарова И. В., Ильинский В. В., Козлова И. А.	235
Вириопланктон, как обычный и массовый компонент речной экосистемы, реагирующий на степень ее антропогенной нагрузки	
Муллаева С. А., Иванова А. А., Сазонова О. И., Петриков К. В., Делеган Я. А., Ветрова А. А.	236
Изучение физиолого-биохимических и генетических особенностей штамма-деструктора углеводов <i>Pseudomonas veronii</i> 7-41 в моно- и бисубстратных системах	
Мустахимов И. И., Решетников А. С., Бут С. Ю.	237
Разработка рекомбинантного штамма <i>Corynebacterim glutamicum</i> направленного на биосинтез пропионата	
Назаров П. А., Шевченко С. А., Каракозова М. В.	237
ToIc-содержащие помпы МЛУ бактерий: что мы знаем о них и о чем они могут нам рассказать.	
Нечаева И. А.	238
Влияние источника азота на продукцию биосурфактантов бактериями-деструкторами углеводов нефти	
Нечаева О. В., Тихомирова Е. И., Шульгина Т. А., Шнайдер Д. А., Заярский Д. А., Беспалова Н. В.	239
Использование полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в медико-биологической практике	
Николаев Ю. А., Дорофеев А. Г., Грачев В. А., Каллистова А. Ю., Берестовская Ю. Ю., Пименов Н. В.	240
Моделирование процесса очистки воды от азота по технологии нитритация/анаммокс	
Николаев Ю. А., Дёмкина Е. В., Канапацкий Т. А., Борзенков И. А., Лойко Н. Г., Григорьева Н. В., Манучарова Н. А., Эль-Регистан Г. И.	240
Биологические и технологические свойства стабилизированных жидких препаратов углеводородокисляющих микроорганизмов	

Новикова О. Б., Ладанова М. А.	241
Биоразнообразие патогенной микрофлоры, выделяемой от сельскохозяйственной птицы	
Носкова Е. В., Кнорре Д. А., Галкина К. В.	242
Тиразол активирует множественную лекарственную устойчивость дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Ожегов Г. Д., Наит Яхиа М., Каюмов А. Р.	243
Антибактериальная активность экстрацеллюлярных метаболитов <i>L. fermentum</i> HFD1	
Октябрьский О. Н., Смирнова Г. В., Тюленев А. В., Музыка Н. Г.	244
Делеции глобальных транскрипционных регуляторов влияют на редокс-статус и толерантность к антибиотикам в растущих и голодающих культурах <i>Escherichia coli</i>	
Олескин А. В., Постнов А. Л., Цао Боянг	245
Влияние нейромедиаторов как коммуникативных агентов на регуляцию функционирования водных экосистем с участием микроорганизмов	
Омарова С. М., Багандова Д. Ш., Ахмедова Р. С., Исаева Р. И., Саидова П. С.	248
Мониторинг микробной обсемененности госпитальной среды родовспомогательного учреждения г. Махачкала	
Орленева А. П., Серебряный В. А., Кутукова Е. А., Ямпольская Т. А.	249
Определение функциональной секретируемой -галактозидазы у <i>Talaromyces cellulolyticus</i>	
Оспенников Ю. В., Демидов А. В., Присяжная Н. В., Дорофеева Л. В., Чижов В. Н., Субботин С. А., Евтушенко Л. И.	249
Культивируемые актинобактерии, ассоциированные с растениями, поражёнными минирующими насекомыми и галлообразующими клещами	
Ошуркова В. И., Пономарева А. Л., Щербакова В. А.	250
Метаногенные археи – модельные объекты космических экспериментов	
Падий Д. А., Веселова В. О., Костров А. Н., Втюрина Д. Н., Плюта В. А., Хмель И. А.	251
Летучие органические соединения, выделяемые микроорганизмами, и наночастицы металлов: особенности действия на бактерии	
Патрушева Е. В., Бавтушный А. А., Сидорук К. В., Изотова А. О., Корженков А. А., Тощакон С. В., Синеокий С. П.	252
Геномное секвенирование алканотрофных микроорганизмов и идентификация детерминантов, определяющих деструкцию нефти	
Петриков К. В., Делеган Я. А., Ветрова А. А.	253
Разнообразие генов алкан монооксигеназ в психротрофном штамме-нефтедеструкторе <i>Rhodococcus erythropolis</i> X5	
Плотников А. О., Балкин А. С., Гоголева Н. Е., Гоголев Ю. В., Черкасов С. В.	253
Особенности метаболизма и вирулентности <i>Salmonella typhimurium</i> в условиях фагоцитоза <i>Acanthamoeba castellanii</i>	
Плюта В. А., Мелькина О. Е., Чурсина М. А., Завильгельский Г. Б., Хмель И. А.	254
Механизм действия циклических монотерпенов (-)-лимонена и (+)- α -пинена на бактериальные клетки	
Позднякова-Филатова И. Ю., Фролова А. А., Захарова М. В.	255
Подбор условий очистки для увеличения выхода рекомбинантного белка SgpR, транскрипционного фактора LysR-семейства	

Поливцева В. Н., Анохина Т. О., Есикова Т. З., Абашина Т. Н., Иминова Л. Р., Сузина Н. Е., Соляникова И. П.	256
Почвенные штаммы-деструкторы: биодеградативная активность и способность к сохранению жизнеспособности	
Пунтус И. Ф., Ахметов Л. И., Филонов А. Е., Понаморева О. Н.	256
Адаптация родококков к ассимиляции твердых углеводов	
Пушкина Н. И., Шакирова А. Р., Летарова М. А.	257
Исследование зависимости частоты лизогенизации <i>E. coli</i> 4S бактериофагом HF4S от множественности инфекции	
Пятибратов М. Г., Сюткин А. С., Безносков С. Н., Чесноков Д. О., Галева А. В., Щеголев С. Ю.	258
Сборка жгутиков галоархей в гетерологичной системе	
Рогов А. Г., Голева Т. Н., Епремян Х. Х., Киреев И. И., Звягильская Р. А.	259
Распространение окислительного стресса в клетках дрожжей	
Руденко А. П., Комова А. В., Мельникова А. А., Намсараев З. Б.	260
Изучение способов стимулирования образования карбонатов микробным сообществом известняка для применения в реставрационных целях	
Рыжих Ю. С., Позднякова-Филатова И. Ю.	260
Выделение и очистка белков нуклеоида Lsr2 и mHf Rhodococcus pyridinovorans 5AP	
Савинова О. С., Глазунова О. А., Моисеенко К. В., Фёдорова Т. В.	261
Биодеструкция фталатов грибами белой гнили	
Сазонова О. И., Ветрова А. А., Соколов С. Л.	262
Штамм <i>Pantoea supripedii</i> 4A – продуцент высокомолекулярных экзополисахаридов	
Самков А. А., Круглова М. Н., Шульга Е. С., Чугунова Ю. А., Волченко Н. Н., Худокормов А. А., Шеуджен Т. М., Самкова С. М.	262
Оценка влияния внесения поллютантов и изменений биоэлектрохимических условий на уровень относительной представленности катаболических генов в анаэробных микробиоценозах	
Самылина О. С., Русанов И. И., Тарновецкий И. Ю., Пименов Н. В.	263
Структура и функционирование пелагических микробных сообществ в зоне и вне зоны разгрузки метановых сипов в море Лаптевых	
Синёва О. Н., Терехова Л. П., Бычкова О. П., Куварина А. Е.	264
Ацидотолерантные актиномицеты рода <i>Micromonospora</i> – потенциальные продуценты антибиотиков	
Сливинская Е. А., Плеханова Н. С., Альтман И. Б., Ямпольская Т. А.	265
Изучение свойств мутантной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы <i>Escherichia coli</i> с двойной кофакторной специфичностью	
Смирнова Г. В., Тюленев А. В., Музыка Н. Г., Октябрьский О. Н.	266
Роль тиоловых редокс-систем в формировании толерантности к канамицину у растущих и голодающих бактерий <i>Escherichia coli</i>	
Смирнова Л. Л.	267
Влияние сообществ перифитонных микроорганизмов на эффективность морских противообрастаемых покрытий	

Смольяков Д. Д., Москвитина М. И., Филатова О. А., Грабович М. Ю.	267
Первый литоавтотрофный представитель рода <i>Sphaerotilus</i> – <i>S. sulfidivorans</i>	
Стадничук И. Н., Кузнецов В. В.	268
Два вида цианобактерий-предшественников хлоропластов, и многообразие пластид у микроводорослей	
Танащук Т. Н., Шаламитский М. Ю., Загоруйко В. И.	269
Декарбоксилирующая способность молочнокислых бактерий вина	
Таратынова М. О., Косихина Ю. М., Юзбашева Е. Ю.	270
Создание штамма дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> продуцента β -каротина	
Тризна Е. Ю., Махмуд Р., Гатина А. Э., Никитина Л. Е., Каюмов А. Р.	271
Антимикробная и антимикотическая активность природных и синтетических терпеноидов	
Трубицын В. Э., Щербакова В. А.	271
Новая водородиспользующая метанообразующая архея из вечной мерзлоты острова Западный Шпицберген	
Тюленев А. В., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н.	272
Продукция сульфида водорода при действии железа II на аэробно растущую культуру <i>Escherichia coli</i>	
Федорова М. С., Миронова А. В., Тризна Е. Ю., Каюмов А. Р.	273
Антимикробная активность внеклеточных метаболитов <i>Staphylococcus aureus</i> в отношении клеток <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , погруженных в биопленку	
Фенюк Борис А.	274
АТФ-синтаза как регулятор величины мембранного потенциала	
Финкельберг И. А. М., Галкина К. В., Маркова О. В., Кнорре Д. А.	274
Роль системы множественной лекарственной устойчивости в захвате экзогенных хинонов клетками дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Фокина В. В., Шутов А. А., Брагин Е. Ю., Донова М. В.	275
Секретируемая холестериноксидаза <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д	
Фокина Н. В., Корнейкова М. В., Сошина А. С., Мязин В. А.	276
Микробиологическое исследование водных экосистем г. Мурманска в условиях загрязнения нефтепродуктами	
Французова Е. Э., Лаптев И. А., Кочаровская Ю. Н., Делеган Я. А.	276
Получение продуцента альфа-кетоглутаровой кислоты на основе штаммов <i>Yarrowia lipolytica</i> 212 и <i>Yarrowia lipolytica</i> 672	
Фуфаева С. Р., Ивашина Т. В., Довбня Д. В., Шутов А. А., Донова М. В.	277
Гетерологическая экспрессия гена <i>kstD2</i> из <i>Nocardioides simplex</i> ВКМ Ас-2033Д в клетках миколицибактерий	
Халилова Э. А., Исламмагомедова Э. А., Абакарова А. А., Аливердиева Д. А.	278
Новый галофильные изоляты родов <i>Halomonas</i> и <i>Virgibacillus</i> (Республика Дагестан)	

Чекрыгин С. А., Пенькова Е. В., Лебедева Н. А., Колос В., Flemming F. E., Schrallhammer M., Потехин А. А.	279
Новые бактерии-симбионты цитоплазмы инфузорий <i>Paramecium bursaria</i> в конкуренции за хозяина	
Чекрыгин С. А., Лебедева Н. А., Потехин А. А.	280
Психрофильные цитоплазматические симбионты инфузории <i>Paramecium caudatum</i>	
Червонцева З. С., Ходжаева Е. С., Гельфанд М. С.	281
Эволюция метаболических локусов в бактериальных геномах	
Чернова Л. С., Каюмов А. Р.	281
Малый белок теплового шока <i>AlpA</i> из микоплазмы <i>Acholeplasma laidlawii</i> способен предотвращать образование амилоидных структур	
Chikov V. I.	282
It's time to understand humanity, why fires in forests	
Шалыгина Р. Р. Редькина В. В.	283
Разнообразие прокариотических и эукариотических фототрофных микроорганизмов в техногенных субстратах и загрязненных почвах Кольской Арктики	
Шапиро Т. Н., Лобакова Е. С.	283
Гены <i>RHLA</i> и <i>SPFO</i> и способность клеток углеводородокисляющих бактерий к синтезу биосурфактантов	
Шаталина Е. С., Худокормов А. А., Карасева Э. В., Моисеева Е. В., Самков А. А., Волченко Н. Н., Гасюк О. А.	284
Деструкция легкой нефти коммерческими нефтеокисляющими биопрепаратами в присутствии аборигенной микрофлоры	
Шашин Д. М., Никитушкин В. Д., Савицкий А. П., Глигонов И. А., Капрельянц А. С., Шлеева М. О.	285
Влияние ионов металлов Mg^{2+} и Zn^{2+} на синтез и накопление порфиринов в покоящихся микобактериях	
Шишкин А. Ю., Смирнов В. Ф., Смирнова О. Н., Фукина Д. Г., Корягин А. В., Сулейманов Е. В., Зеленова Е. О.	286
Антимикробный эффект фотокаталитически активных микро- и наноразмерных частиц оксидов металлов	
Щербакова П. А., Гавирова Л. А., Шестакова О. О., Исаченко А. И., Шестаков А. И.	287
Распылительное высушивание и оценка выживаемости при хранении психоактивных углеводородокисляющих микроорганизмов	
Юдкина А. В., Гарсиа-Диас М., Жарков Д. О.	287
Структура новой атипичной ДНК-гликозилазы супесемейства H2TH из <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i>	
Юрченко Е. Г., Савчук Н. В.	288
Фузариозное усыхание – новое вредоносное грибное заболевание винограда в регионе Западного Предкавказья (Россия)	
Якушев А. В., Карабанова А. А., Никитина С. А., Ефименко Т. А., Демьянкова М. В., Глухова А. А., Грачёва Т. А., Ефременкова О. В.	289
Антимикробные спектры актиномицетов, выделенных из кишечника беспозвоночных животных	

Яхиа Наит М., Ожегов Г. Д., Каюмов А. Р.	290
Внеклеточные антибактериальные соединения из нового штамма <i>L. fermentum</i> AG8	
Дилбарян Д. С., Каташинский А. И., Васильченко А. С.	290
Получение и свойства антимикробных метаболитов <i>Bacillus velezensis</i> X-Bio-1	
Яшников А. В., Васильченко А. С.	291
Экстракт коры дуба как средство защиты растений от <i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Галева А. В., Сюткин А. С., Павлова Е. Ю., Пятибратов М. Г.	292
Тат-нити – новый тип поверхностных структур галофильных архей	
Маградзе Е. И.	293
Технологические аспекты получения бактериальных удобрений на молочной сыворотке	
Маркова Ю. А., Беловежец Л. А., Левчук А. А., Оборина Е. Н., Адамович С. Н.	293
Использование биологически активных соединений как модуляторов роста и метаболизма <i>Rhodococcus qingshengii</i> vkm AC-2784D	
Кешелава В. Б.	294
Постгеномная биология: новые задачи / новые инструменты	
Агафонова Н. В., Капаруллина Е. Н., Розова О. Н., Доронина Н. В.	295
<i>Methyloligella Maris</i> Sp. Nov., новые метилотрофные бактерии, выделенные из морской среды	

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ ВНУТРЕННЕЙ АЗИИ

Бархутова Д. Д., Абидуева Е. Ю., Дагурова О. П., Зайцева С. В., Лаврентьева Е. В.

ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, гУлан-Удэ
darima_bar@mail.ru

Уникальной особенностью региона Внутренней Азии является широкое распространение экстремальных местообитаний, которые являются местами выживания, сохранения и активной геохимической деятельности микробных сообществ, а также резервуарами выделения экстремофилов, имеющих биотехнологический потенциал. Минерализованные озера, холодные и термальные местообитания представляют собой модель для изучения эволюционных процессов, механизмов адаптации сообщества к экстремальным условиям, динамики сообщества под воздействием различных факторов. В связи с этим актуально проведение исследований, связанных с изучением разнообразия и функционирования микробных сообществ экстремальных природных экосистем Внутренней Азии.

Объектами исследования были соленые и содовые озера, горячие и холодные источники Бурятии, Забайкальского края, Монголии и Внутренней Монголии (Китай). При выполнении исследования применялся комплекс гидрохимических, микробиологических, изотопных, молекулярно-биологических и биоинформационных методов.

Определен таксономический состав микробных сообществ содовых и соленых озер с минерализацией от 15 до 495 г/л. В микробном сообществе минерализованных озер наиболее распространенными были филумы *Gamma*proteobacteria (до 45 %) и *Bacteroidetes* (до 42 %). Показано влияние солености на состав микробного сообщества; с возрастанием минерализации озера обнаружено увеличение доли архей и вклада аноксигенных и хемолитотрофных бактерий в процессы продукции. В микробных сообществах установлено доминирование галофильных и галотолерантных бактерий, среди которых наиболее многочисленны были бактерии рода *Halomonas*. Среди архей доминировали представители экстремально-галофильных родов *Halorubrum* и *Halohasta*. Впервые определено микробное разнообразие щелочных (сульфатного и содового) озер Байкальской рифтовой зоны (БРЗ), состав минеральных вод которых обусловлен разгрузкой термальных вод. Впервые определен таксономический состав микробных сообществ в различных биотопах гидротерм БРЗ зоны, выявлена пространственная стратификация сообщества. В сообществе высокотемпературных зон (61–73 °С) выявлена высокая доля термофильных бактерий *Deinococcus-Thermus* (до 50 %) и весомая доля экстремально термофильных бактерий филума *Aquificae* (до 10 %). Выявлено высокое обилие представителей филума *Acetothermia* (до 58 %), который является одной из глубоких ветвей домена *Bacteria*. Продукционный компонент микробного сообщества осадков синтезирует органическое вещество, используя вулканогенную углекислоту, обогащенную тяжелым изотопом $\delta^{13}\text{C}$. Главными экологическими факторами, влияющими на формирование разнообразия бактерий в озерах, являются минерализация и концентрации ионов натрия и гидрокарбонатов, а в источниках - минерализация, содержание ионов натрия, хлора и сульфатов, а также температура. Выявлены таксоны, которые ответственны за сходство/различие состава микробных сообществ озер и источников.

Установлено, что микробное сообщество гидротерм обладает различным спектром внеклеточных пептидаз, адаптированных к условиям обитания микроорганизмов. Протеолитические бактерии секретируют термостабильные и щелочеустойчивые сериновые субтилизин-подобные пептидазы, имеющие стабильность до 65°C и pH до 11,5. Из высокоминерализованных озер выделены протеолитические гало-алкалофильные бактерии рода *Halomonas*, обладающие аминопептидазной активностью.

Полученные новые данные о структуре микробных сообществ экстремальных экосистем Внутренней Азии позволили выявить особенности функционирования этих экосистем и дополнить банк данных о разнообразии экстремофилов.

Исследования выполнены в рамках темы госзадания «Микробные сообщества экстремальных природных экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотехнологический потенциал (№ госрегистрации 121030100229-1).

АНАЭРОБНЫЙ ЦИКЛ ЖЕЛЕЗА В АЛКАЛОФИЛЬНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ

Заварзина Д. Г.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва
zavarzinatwo@mail.ru

Биогеохимический цикл железа доминировал в геологической истории Земли в Архее — раннем Протерозое, в течение более 1,5 млрд лет, и оставил четко диагностируемый след в виде образовавшихся за этот период железистых кварцитов — осадочных тонкослоистых пород, состоящих в основном из кварца и минералов железа — гематита (Fe_2O_3), магнетита (Fe_3O_4) и сидерита (FeCO_3). Поскольку накопление этих пород происходило в восстановительных условиях, механизм массового отложения окисленных минералов железа до сих пор является дискуссионным. Открытие в конце прошлого века анаэробных микроорганизмов, способных восстанавливать и окислять минералы железа в процессе хемосинтеза, дало возможность геологам считать биогенный фактор одним из ведущих в образовании этих пород. Таким образом, не будет преувеличением сказать, что значительную часть истории Земли микробный анаэробный цикл железа имел планетарное значение, контролировал осадконакопление и внес значительный вклад в формирование древней биосферы.

Тонкая слоистость железистых кварцитов указывает на то, что эти породы отлагались в спокойных глубоководных, либо, наоборот, мелководных внутриконтинентальных обстановках. Физико-химические условия, существовавшие на континентах в докембрии, способствовали формированию содовых водоемов, площадь которых могла значительно превышать современные. Предложенная в 1993 году Г. А. Заварзиним концепция «содового континента», как центра биоразнообразия в докембрии, явилась мощным стимулом для всестороннего исследования алкалофильных микробных сообществ в нашей стране. В частности, было начато системное изучение микроорганизмов цикла железа.

В результате проведенных исследований удалось доказать, что способность к диссимиляционной железоредукции свойственна многим анаэробным алкалофилам. Были выделены как литоавто-, так и органогетеротрофные железоредукторы. Метастабильность многих минералов железа в щелочных восстановленных условиях делает термодинамически выгодными многие реакции, не идущие в нейтральных условиях. В опытах с *Geoalkalibacter ferrihydriticus* была доказана его способность к анаэробному окислению закисного железа, содержащегося в силикатах (биотит, глауконит) и сидерите, за счет восстановления карбонатов. Таким образом, помимо двух известных ранее механизмов, фото- и нитрат-зависимого анаэробного окисления железа, был выявлен третий возможный путь — карбонат-зависимый. Преимущество этого пути применительно к процессам осадконакопления в Архее — раннем Протерозое определяется отсутствием лимитирующих факторов, таких как свет или наличие окисленных форм азота.

Итак, несмотря на доминирование цикла серы в современных содовых озерах, многие алкалофилы способны как восстанавливать, так и окислять минералы железа в анаэробных условиях, что можно рассматривать как реликтовую функцию, не утраченную со времен доминирования цикла железа в докембрии.

МИКРОБНАЯ «ТЁМНАЯ МАТЕРИЯ» ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ

Кадников В. В.¹, Марданов А. В.¹, Карначук О. В.², Равин Н. В.¹

¹ Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

² Томский государственный университет, Томск
vkadnikov@bk.ru

Подземные экосистемы Земли являются одними из крупнейших мест обитания микроорганизмов, а общая биомасса составляет значительную часть всей биосферы. Подземные экосистемы могут оставаться изолированной от поверхности от тысяч до миллионов лет и не зависеть от поступления органического вещества с поверхности.

Мы изучили микробные сообщества глубинных термальных водоносных горизонтов в мезозойских осадочных породах Западно-Сибирского региона с помощью метагеномного подхода. Были исследованы географически удаленные водоносные горизонты, доступ к которым осуществлялся через нефтепоисковые скважины глубиной 2–3 км. Метагеномный анализ выявил три типа микробных сообществ. Сообщества первого типа (скважины ЗР и Vi-1) состояли в основном из хемолитоавтотрофов, – метаногенных архей (*Methanothermobacter*) и сульфат-редуцирующих *Firmicutes* и/или *Deltaproteobacteria*. Второй тип сообществ (скважина 1-R) содержал сульфат-редуцирующие *Firmicutes* и *Deltaproteobacteria*, а также различные некультивируемые линии филумов *Chlorofexi*, *Ignavibacteriae*, *Aminicenantes* и *Riflеbacteria*, археи отсутствовали. Анализ геномов *Chlorofexi*, *Ignavibacteriae*, *Riflеbacteria* и *Aminicenantes* показал, что они могут сбраживать углеводы, а некоторые способны к аэробному и/или анаэробному дыханию. Вероятно, захороненное органическое вещество мезозойских отложений является субстратом для их роста, а образуемые водород и ацетат используются сульфат-редукторами. Микробное сообщество третьего типа (скважина 5P) включало примерно равные доли бактерий и метаногенных архей. Среди бактерий найдены органотрофные представители *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Ignavibacteriae*, *Armatimonadetes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Spirochaeta*. Сульфат-редукторы составляли небольшую долю и были представлены *Ca. Karabacteria* и *Thermodesulfovibrio*.

Анализ метагеномов позволил получить более ста геномов микроорганизмов, в том числе представителей «некультивируемых» филумов *Aminicenantes*, *Bipolaricaulota*, *Patescibacteria*, *Atribacteria*, *Armatimonadetes*, *Riflеbacteria*, WOR-3 и BRC1. В докладе будут представлены результаты геномного анализа этих бактерий, в том числе реконструкции путей метаболизма и анализа их функциональной роли в подземной биосфере. Построены экологические модели исследованных подземных экосистем. Работа поддержана Российским научным фондом (проект 19-14-00245).

ЭНДОФИТНЫЕ ДРОЖЖИ В ПЛОДАХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Качалкин А. В., Глушакова А. М., Стрелецкий Р. А., Савченко В. Е., Венжик А. С.

МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, kachalkin_a@mail.ru

Исследование эндофитных дрожжей – актуальное междисциплинарное направление на стыке фундаментальной и прикладной науки. Для характеристики эндофитного сообщества изучены около 80 наименования плодов (фрукты, овощи и орехи) из 38 стран, включая выращенные в России. Закупки сельскохозяйственной продукции российского и зарубежного происхождения осуществлялись в розничных магазинах Москвы и Московской области. Исследование проводили по следующей схеме: стерилизация поверхности – отбор внутренних тканей – приготовление суспензии – посев – создание коллекции эндофитных дрожжей – видовая идентификация – анализ физиологических свойств.

Результаты показали, что медианная численность эндофитных дрожжей в исследованных плодах составила $2,35 \times 10^3$ КОЕ/г, обнаружено 102 вида дрожжей: 52 вида аскомицетов

и 50 – базидиомицетов. Дрожжи-аскомицеты преобладали почти во всех исследованных группах сельскохозяйственной продукции, их средняя доля была около 75 %. Анализ данных показал заметное различие группировок дрожжей в отечественной и в импортной продукции, а также отличие плодово-ягодной культур от овощей. Максимальное разнообразие эндофитных дрожжей было обнаружено в тропических плодах. В отечественных и в импортных плодах с высокой частотой встречаемости были обнаружены виды: *Candida zeylanoides* (18 %), *Aureobasidium pullulans* (16%), *Debaryomyces fabryi* (16 %), *D. hansenii* (16 %), *Meyerozyma caribbica* (15 %), *Metschnikowia pulcherrima* (13 %), *C. parapsilosis* (13 %), *Hanseniaspora uvarum* (12 %), *Rhodotorula mucilaginosa* (10 %), *Mey. guilliermondii* (10 %), *Rh. babjevae* (6 %). В ходе выполненного исследования обнаружены и описаны новые виды: *Candida pellucida*, *Cyberlindnera dauci*, *Metschnikowia taurica* и *Vishniacozyma phoenicis*.

Созданная коллекция эндофитных дрожжей позволила оценить стимулирующие рост растения свойства культур и отобрать штаммы, которые можно использовать в качестве био-контроля развития фитопатогенов. Обнаружено, что около 70% штаммов дрожжей способны синтезировать фитогормоны (ауксин и зеатин); около 20% штаммов проявили антагонизм к исследованным фитопатогенным грибам при их совместном культивировании.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-74-10002.

МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЦИКЛА МЕТАНА В АРКТИЧЕСКИХ МОРЯХ

Пименов Н. В.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
npimenov@mail.ru

Глобальные климатические изменения на нашей планете, сопровождающиеся усилением таяния арктических льдов и повышением температуры морей Северного-Ледовитого океана, вызывают активизацию всей трофической цепи, начиная от повышения интенсивности первичной продукции и заканчивая терминальной фазой минерализации органического вещества с образованием в восстановленных зонах осадочных отложений сероводорода и метана. Деградация мерзлоты приводит также к расконсервации древних осадочных отложений, обогащенных органическим веществом и биогазами (прежде всего, метаном), что сопровождается формированием в Арктических морях сиповых полей разгрузки метана различного масштаба.

Долгое время считалось, что постоянно низкие температуры должны вызывать существенное замедление скоростей основных биогеохимических процессов круговорота биогенных элементов в Арктике. Однако, исследования последних десятилетий выявили «горячие точки», где в условиях постоянного потока необходимых субстратов, скорости микробных процессов при низких температурах сопоставимы с интенсивностями процессов, происходящих в водоемах умеренных и теплых климатических зон. Именно к таким зонам повышенной микробной активности относят зоны разгрузки метановых сипов, которые достаточно широко распространены в морях Арктического бассейна. Классическим примером «оазисов жизни» на дне океана за полярным кругом является грязевой вулкан Хаакон Мосби, открытый более 25 лет назад и недавно обнаруженные поля метановых сипов в море Лаптевых. В этих районах разгрузка метана сопровождается развитием характерных микробных сообществ, основу которых составляют аэробные метанооксиляющие бактерии, а также консорциумы метанотрофных архей и сульфатредуцирующих бактерий. Высокая интенсивность сульфатредукции приводит к распространению восстановленных осадков практически до поверхности, граничащей с кислородсодержащей водной толщей. Такие условия способствуют формированию на поверхности осадков сипов микробных матов при участии разных представителей сероокисляющих бактерий. Еще одним индикатором метановых сипов являются скопления трубчатых червей, развивающихся благодаря симбиозу с метанотрофными бактериями.

Наряду с метановыми сипами повышенные активности микроорганизмов цикла метана наблюдаются в зонах выноса крупных сибирских рек, на литорали и в морских заливах искусственного и естественного происхождения с ограниченным водообменом.

В последние годы большой интерес вызывают процессы образования метана не связанные с деятельностью анаэробных метаногенных архей. Поверхностные кислородсодержащие воды различных регионов Мирового океана, в том числе и морей Арктического бассейна, часто бывают пересыщены метаном по отношению к атмосфере — явление, которое называют «морским метановым парадоксом». В водной толще моря Лаптевых, где в аэробной зоне на глубине 25–30 м наблюдается локальное повышение содержания метана, нами были выявлены гидрохимические предпосылки и возможные микробные агенты для аэробной продукции метана через деметилирование метилфосфоната и при разложении диметилсульфопропионата.

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОЗОВ ИНFUЗОРИЙ С БАКТЕРИЯМИ

Потехин А. А.

Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет,
кафедра микробиологии, alexey.potekhin@spbu.ru

Симбиозы между инфузориями и бактериями широко распространены в природе. Наиболее изучены симбиотические системы, где в качестве хозяина выступают инфузории *Paramecium* и *Euplotes*.

За последние несколько лет нами обнаружено и охарактеризовано более десятка новых симбиотических систем между инфузориями *Paramecium* и бактериями. В основном эти бактерии относятся к порядкам *Holosporales* и *Rickettsiales* (*Alphaproteobacteria*). Разные симбионты обладают различной специфичностью по отношению к хозяевам, в то время как одни строго видоспецифичны, другие характеризуются широким промискуитетом. Бактерии могут колонизировать разные компартменты клетки-хозяина, некоторые симбионты обладают сложными инфекционными циклами, в то же время многие симбионты не демонстрируют выраженной способности к проникновению в клетки инфузорий. Мы показали, что симбионты могут не только активно заражать новые клетки хозяев, попадая внутрь инфузорий при фагоцитозе, но и передаваться между инфузориями при половом процессе. В основном симбионты паразитируют на инфузориях, но иногда симбиозы взаимовыгодны: так, бактерии *Caedibacter* и *Caedimonas* придают своим хозяевам киллер-свойства, позволяя зараженным инфузориям выигрывать конкуренцию у апосимбионтных особей. Иногда инфузорию населяют одновременно два и более вида микроорганизмов, состоящих друг с другом в антагонистических или в нейтральных отношениях. Нами обнаружены бактерии двух родов, относящихся к новому семейству *Deianiraeaceae* (*Rickettsiales*). Эти бактерии являются эпибионтами, атакуя инфузорию из внешней среды, быстро размножаясь на поверхности клетки и, в итоге, убивая хозяина. Наконец, инфузории также обладают собственными комплексными микробиомами.

В докладе будут рассмотрены способы взаимодействий между партнерами по симбиозу, роль симбиотических бактерий в популяциях инфузорий-хозяев и эволюционное значение таких симбиозов. Разнообразие симбионтов инфузорий и тактик, используемых ими для выживания внутри клеток и расселения в популяциях хозяев, позволяет рассматривать такие симбиотические системы как модель для эволюционной биологии, а также указывает на важную роль симбиотических бактерий в экологии одноклеточных эукариот.

Поддержано грантом РФФ 20-14-00220.

МЕТАБОЛИЗМ И ГЕНОМИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

МЕХАНИЗМЫ АВТОТРОФНОЙ ФИКСАЦИИ CO₂ У ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Берг И. А.

Институт молекулярной микробиологии и биотехнологии, Университет Мюнстера, Германия,
ivan.berg@uni-muenster.de

В настоящее время известны семь путей автотрофной фиксации CO_2 , пять из которых функционируют у бактерий. Три из них – цикл Кальвина-Бенсона, восстановительный цикл трикарбоновых кислот и восстановительный ацетил-СоА путь – получили широкое распространение среди бактерий различных филогенетических и физиологических групп. Доклад будет посвящен метаболизму двух автотрофных термофильных бактерий – сероредуцирующей термофильной ($T_{\text{опт}} 55\text{ }^\circ\text{C}$) дельтапротеобактерии *Desulfurella acetivorans* и нитратредуцирующего термофильного ($T_{\text{опт}} 70\text{ }^\circ\text{C}$) представителя Thermoanaerobacterales *Ammonifex degensii*. Для автотрофной ассимиляции CO_2 , *D. acetivorans* использует необычный вариант восстановительного цикла трикарбоновых кислот, в котором цитрат расщепляется на ацетил-СоА и оксалоацетат при участии цитратсинтазы, без использования энергии гидролиза АТФ для осуществления этой эндергонной при стандартных условиях реакции (Mall et al., 2018). Функционирование этого варианта восстановительного цикла трикарбоновых кислот требует повышенной концентрации CO_2 в среде (Steffens et al., 2021). *A. degensii* использует при автотрофном росте либо цикл Кальвина-Бенсона, либо восстановительный ацетил-СоА путь, в зависимости от условий роста, представляя собой уникальный пример организма с двумя различными автотрофными путями. Эти примеры демонстрируют наличие у термофильных бактерий ранее неизвестных стратегий ассимиляции CO_2 , которые могут быть широко распространены в микробном мире.

ЭВОЛЮЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ

Гельфанд М. С.

Сколковский институт науки и технологий, m.gelfand@skoltech.ru

Десятки тысяч секвенированных бактериальных геномов дают возможность изучать их эволюцию на разных уровнях.

Сравнивая близкие геномы как последовательности нуклеотидов, можно определять характерные контексты мутаций (мутационные подписи), а включив в рассмотрение лабораторные штаммы, в которых повреждены те или системы репарации, можно определить специфические для них паттерны мутаций и, таким образом, понять роль этих систем в эволюции природных штаммов. На больших эволюционных расстояниях можно определять консервативные участки в межгенных областях; такие участки часто являются регуляторными сайтами. Продолжение такого анализа дает возможность не только описывать эволюцию регуляторных сетей и ко-эволюцию факторов транскрипции и узнаваемых ими ДНКовых мотивов, но и определять функциональную специфичность новых ферментов и транспортеров. Наконец, анализ последовательностей дает возможность оценить частоту гомологичной рекомбинации и, стало быть, определить долю вертикально наследуемой и горизонтально перенесенной части генома.

Рассматривая же геном как последовательность или даже просто набор генов, можно оценивать потоки геномных перестроек, потерь и приобретений генов, возникновения и развития вторых хромосом, существующих в ряде бактериальных групп. Это особенно интересно применительно к молодым патогенам, которые сильно меняют стиль жизни. Оказывается, что это сопровождается размножением транспозонов, увеличением числа инверсий, что, в свою очередь, уменьшает частоту гомологичной рекомбинации (например, у шигелл в сравнении с кишечными палочками). С другой стороны, при сопоставлении множества штаммов возникает возможность находить параллельные инверсии (одни и те же события, происходящие независимо в различных ветвях дерева штаммов). Такие инверсии могут быть механизмом фазовой вариации, благодаря которой патоген избегает давления со стороны иммунной системы хозяина.

РЕПАРАЦИЯ ДНК: ЗА ПРЕДЕЛАМИ МОДЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Жарков Д. О.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, dzharkov@niboch.nsc.ru

Система эксцизионной репарации оснований ДНК (ЭРО) отвечает за удаление многих продуктов окисления, дезаминирования, алкилирования и апуринизации ДНК. В ходе ЭРО один из нескольких ферментов, принадлежащих к группе ДНК-гликозилаз, выщепляет поврежденное основание, после чего целостность ДНК восстанавливается последовательным действием апурин-апиримидиновых (АП-) эндонуклеаз, ДНК-полимераз и ДНК-лигаз. Хотя состав хорошо изученных систем ЭРО в клетках человека и *E. coli* ограничен 20–30 полипептидами, недавние открытия в других биологических видах указывают на существование белков ЭРО, отсутствующих в хорошо изученных модельных организмах. В работе проведен поиск полипептидов и их доменов, образующих функционально не охарактеризованные семейства, предположительно участвующие в репарации ДНК.

Все последовательности, гомологичные известным ДНК-гликозилазам из структурного суперсемейства «спираль — два поворота — спираль», можно сгруппировать в 12 семейств, 5 из которых не охарактеризованы биохимически. Была определена субстратная специфичность таких белков из *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces coelicolor* и *Bacteroides thetaiotaomicron* по отношению к окисленным основаниям разной природы, и установлена пространственная структура белка из *B. thetaiotaomicron*, отличающегося своим каталитическим центром от других гликозилаз этой группы. Аналогичным образом, последовательности, гомологичные известным урацил-ДНК-гликозилазам, группируются в 9 семейств, 3 из которых не охарактеризованы. Был изучен белок из *Pseudomonas syringae*, который обладал способностью удалять из ДНК как урацил, так и окисленные пиримидины.

ДНК-гликозилаза MutY *E. coli* и ее гомолог MUTYH человека несут каталитически неактивный С-концевой домен, гомологичный белкам суперсемейства NUDIX, гидролизующим мононуклеотидные субстраты, в том числе поврежденные dNTP. Все последовательности белков NUDIX можно разделить на 54 семейства. Сравнение последовательностей и компьютерное моделирование структур и их взаимодействий с поврежденным основанием 8-оксогуанином позволило определить предполагаемый сайт первичного узнавания повреждения ДНК, не очевидный из пространственной структуры белка MutY.

АП-эндонуклеазы расщепляют ДНК по АП-сайтам, остающимся после действия ДНК-гликозилаз, а также обладают 3' → 5'-экзонуклеазной, 3'-фосфодиэстеразной и 3'-фосфатазной активностью. Основная АП-эндонуклеаза человека (APEX1), принадлежит к суперсемейству экзонуклеаз–эндонуклеаз–фосфатаз, а ее гомологи могут быть сгруппированы в 5 семейств. Анализ эволюции некаталитических доменов АП-эндонуклеаз показывает, что в этой группе белковые домены, отвечающие за репарацию ДНК, часто сочетаются с функциональными модулями, работающими как редокс-сенсоры, факторы рекомбинации, домены олигомеризации и т. п.

В целом анализ систем репарации ДНК в организмах, не принадлежащих к узкому числу лабораторных моделей, служит мощным инструментом для исследования функций белков репарации и может стать источником ценных инструментов для молекулярной биотехнологии.

Работа поддержана государственным заданием АААА-А17-117020210023-1.

РЕНЕССАНС КУЛЬТИВОВАНИЯ В ПОСТГЕНОМНОЕ ВРЕМЯ

Карначук О. В.

Кафедра физиологии растений и биотехнологии,
Томский государственный университет, Томск, olga.karnachuk@green.tsu.ru

Культивирование микроорганизмов на питательных средах, несколько утратившее свое значение во времена интенсивного развития молекулярных методов, возрождается на новой

основе. Современные подходы к выделению и культивированию прокариот наряду с новыми методами выращивания клеток предполагают использование молекулярных данных. Последние включают: (1) подбор условий культивирования для целевых микроорганизмов на основе известных профилей гена 16S рРНК в биотопе; (2) предсказание метаболизма целевых изолятов из метагеномных данных; (3) подбор субстратов роста и ингибирующих агентов из композитных геномов целевых организмов. Будут продемонстрированы примеры использования геномной информации для выделения ранее некультивируемых бактерий-обитателей подземной биосферы. Характерной чертой современного культивирования, использующего молекулярные данные и новые технологии, является появление большой когорты «трудно-культивируемых» микроорганизмов, чья таксономическая валидация затруднена в силу низких скоростей роста клеток.

Очевидно, что физиологические эксперименты и определение активности прокариот при описании биогеохимических процессов в биотопах необходимы для верификации результатов, полученных путем амплификации и высокопроизводительного секвенирования ДНК. Необходимость культивирования наряду с молекулярными данными будет продемонстрирована на примере изучения микробного сульфидогенеза в отходах животноводства. Культивирование и определение активности в условиях *in situ* показали, что представляющие «редкую биосферу» *Desulfovibrio*, являются основными агентами, осуществляющими «криптическую» сульфатредукцию и вносящим основной вклад в образование H_2S в отходах крупной свинофермы. Использование подхода, основанного только на профилировании гена 16S рРНК, не позволяет оценить роль микроорганизмов, присутствующих в биотопе в незначительных количествах.

Исследования поддержаны грантами РФ (21-14-00114) и РФФИ (18-29-25041; 19-04-00981).

РАЗЛОЖЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫМИ АРХЕЯМИ

Кубланов И. В.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии», kublanov.ilya@gmail.com

Известно, что биodeградация сложно разлагаемых полисахаридов растений, таких как целлюлоза или ксилан, в природе происходит за счет деятельности бактерий и грибов. До недавнего времени не было сведений о способности архей участвовать в этом процессе. Тем не менее, археи обладают такой способностью. Более того, многочисленные работы по исследованию геномов архей или метагеномов микробных сообществ, в которых археи составляют значимую часть, выявляют гены, кодирующие различные ферменты, участвующие в разложении, образовании или модификации гликозидных связей (т. н. «CAZymes»). Поскольку археи являются обитателями наиболее экстремальных экотопов, то и их ферменты характеризуются повышенной стабильностью по отношению к различным физико-химическим воздействиям. Все это делает археи огромным резервуаром новых и высокостабильных ферментов, способных разлагать полисахариды, а поиск таких архей и ферментов – актуальной задачей, для решения которой необходимо вовлечение разнообразных подходов, включающих культуральные, молекулярно-генетические и биохимические методы.

В ходе работы по поиску новых гликозидаз гипертермофильных архей нам удалось обнаружить новые гликозидазы: уникальную мультидоменную и мультифункциональную гликозидазу (MDG) из *Thermococcus* sp. 2319×1, а также 4 новых целлюлазы из *Thermofilum adornatum* 1910b. Обе археи способны расти на целлюлозе и других полисахаридах, что служило отправной точкой поиска термостабильных целлюлаз, а также помогло в проверке свойств, предсказанных в ходе *in vitro* и *in silico* экспериментов.

MDG состоит из пяти доменов, три из которых являются каталитическими. Оказалось, что рекомбинантные каталитические домены способны функционировать как самостоятельные ферменты, и каждый из них, обладая собственной эволюционной историей, каталити-

ческими и структурными особенностями, играет свою роль в гидролизе целлюлозы и других олиго- и полисахаридов.

В ходе геномного и протеомного анализа *T. adornatum* 1910b были предсказаны четыре фермента, участвующие в разложении целлюлозы, два из которых представляют известные семейства гликозидаз (GH1 и GH3), для которых целлюлазная активность не была показана ранее, а два других являются первыми представителями новых семейств гликозидаз. Все четыре рекомбинантные гликозидазы были активны по отношению к целлюлозе, ее производным, а также к некоторым другим полисахаридам. В отличие от *Thermococcus* sp. 2319x1, за мультифункциональность которого отвечают три каталитических домена одной целлюлазы у *T. adornatum* 1910b различные функциональные роли распределены между четырьмя отдельными гликозидазами.

Таким образом, наши результаты показывают, что гипертермофильные археи могут служить источником новых термостабильных гликозидаз с различными свойствами и функциями.

РНК-СЕКРЕТОМ БАКТЕРИЙ

Озолин О. Н., Шавкунов К. С., Маркелова Н. Ю., Глазунова О. А., Аликина О. В.,
Киселев С. С., Панюков В. В.

Институт биофизики клетки, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино,
ozoline@rambler.ru

Внеклеточные РНК (exRNA) изучают уже более 10 лет, после того как стало ясно, что в составе липидных везикул или в комплексе со специальными белками микроРНК эукариот могут адресно доставляться в другие клетки, влияя на экспрессию их генов. Это обусловлено наличием у эукариот систем РНК-интерференции (RNA induced silencing complex). У бактерий нет таких систем, но они тоже могут реагировать на микроРНК хозяина, а бактериальные РНК могут проникать в его клетки, вызывая иммунный ответ. В обоих случаях в этом могут участвовать отсутствующие у бактерий белки систем интерференции эукариот. Вопрос об использовании бактериями exRNA для адресного воздействия на метаболизм других бактерий пока остаётся открытым, хотя возможность создания безопасных для микробиома вид-специфичных антибиотиков чрезвычайно актуальна.

Доступность полноценного сравнительного анализа транскриптомов и exRNA, полученных для бактерий разных видов в условиях индивидуального и совместного роста, открыла возможность предметного изучения их взаимного влияния.

В нескольких лабораториях установлено, что спектры вне- и внутриклеточных РНК кишечной палочки (*E. coli* K12 MG1655) отличаются, что предполагает некоторую селекцию РНК для секреции, но механизмы её пока совсем не понятны. Нами установлено, что присутствие *Rhodospirillum rubrum* или *Prevotella copri* изменяет спектр exRNA *E. coli*, увеличивая вклад РНК, гомологичных другим геномам. Это ориентирует дальнейшие исследования на учёт возможности участия exRNA в системах, основанных на комплементарных взаимодействиях. С использованием конфокальной микроскопии и меченных флуоресцентной меткой РНК из секретомов *R. rubrum* и *P. copri* было зарегистрировано их проникновение в клетки *E. coli*. Одна из них ингибировала рост *E. coli*, а другая его активировала, что свидетельствует о возможности прямого воздействия чужих РНК на геном или транскриптом реципиента. Чтобы исключить артефакт, обусловленный искусственной добавкой РНК, был поставлен эксперимент, в котором клетки *E. coli* и *R. rubrum* или *P. copri* росли в двух отсеках общей камеры, разделённых мембраной, непроницаемой для клеток. В обоих случаях внутри клеток *E. coli* были обнаружены чужие РНК.

Таким образом, стало ясно, что exRNA могут участвовать в межвидовых взаимодействиях бактерий, но многие вопросы, связанные с их синтезом и доставкой в целевые клетки, пока находятся на этапе осмысления и формулировки.

Работа выполнена в рамках Проекта, поддержанного РФ (гранты №№ 18-14-00348 и 18-14-00348-П).

МИКРОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВКЛЮЧАЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В СИСТЕМАХ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

Андронов Е. Е., Проворов Н. А.

ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, eeandr@gmail.com

В истории эволюционного учения вопросы эволюции микроорганизмов долгое время занимали довольно скромное место, и все основные эволюционные концепции были разработаны в основном для высших организмов. Отчасти это объяснялось сложностью выделения микроорганизмов из окружающей среды, а также весьма специфической и не всем доступной техникой работы с чистыми культурами. Однако сегодня, когда основные технические проблемы экспериментальной эволюционной микробиологии решены, а базовые технологии современной геномики и метагеномики, биоинформатики и эволюционной статистики стали уже исследовательской рутинной, становится понятно, что область эволюционного анализа микроорганизмов обладает исключительно высоким эвристическим потенциалом. Объясняется это компактностью микробных геномов, делающей возможным их массовое секвенирование, относительной полнотой их аннотаций (по сравнению с высшими организмами), а также исключительно высокими темпами их эволюции.

Особое место среди микроорганизмов занимают ризобии, в симбиозе с бобовыми растениями осуществляющие фиксацию атмосферного азота, полностью обеспечивая растения азотным питанием. Важность ризобий в эволюционной микробиологии объясняется не только их сельскохозяйственной значимостью, но и тем, что их эволюция происходит в тесном контакте с эволюцией макросимбионта, который является одним из основных факторов эволюции микросимбионта. Поэтому коэволюция симбиотических систем ризобий и их хозяев представляет собой интереснейшую и весьма эффективную эволюционную модель, где изменения в одном из генетических компонентов макросимбионта связаны с изменениями в комплементарных генетических структурах микросимбионта, демонстрируя не так редко, как в других системах, признаки движущего отбора.

В настоящем сообщении мы подытожим результаты многолетних исследований эволюции симбиотических систем на уровне генов, геномов и метагеномов с использованием комплекса современных подходов, биоинформатики и молекулярного моделирования, включающих анализ обычных и реликтовых симбиотических систем. Будет показано, что бобово-ризобиальный симбиоз является очень красивой эволюционной моделью, в которой ясно и весьма определенно можно разграничить процессы видообразования, макро- и микроэволюции и с довольно большой степенью достоверности реконструировать эволюционные пути симбиотических систем, берущих свое начало в глубокой эволюционной древности.

Поддержано грантом РФ № 19-16-00081

НОВЫЕ РУБЕЖИ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ, ОСНОВАННЫХ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Дедыш С. Н.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва
dedysh@mail.ru

Аэробные метанотрофные бактерии – это группа прокариот, специализированных на использовании метана в качестве источника углерода и энергии. Эта уникальная способность

метанотрофов обуславливает их высокий биотехнологический потенциал. Микробная конверсия метана, являющегося доступным и сравнительно дешевым сырьем, открывает перспективы производства биопротеина и ряда других продуктов с добавленной стоимостью. Промышленное производство кормового белка (Гаприна) из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 было реализовано в СССР в середине 1980-х. В настоящее время эта технология переживает этап трансформации в технологию второго поколения, в том числе за счет поиска новых штаммов-продуцентов, что являлось целью этой работы. Для поиска новых штаммов метанотрофов использовали образцы, отобранные из природных и техногенных местообитаний с высокой доступностью метана – активный ил очистных сооружений, осадки пресноводных водоемов и покрывающую почву полигона твердых бытовых отходов. Работы по культивированию позволили получить 4 изолята термотолерантных метанотрофов, обнаруживающих 98,56–99,35 % сходства последовательностей гена 16S рНК с таковой у *Mc. capsulatus* Bath. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений позволила получить замкнутые геномы размером от 3,2 до 4 млн п. о. Пангеномный анализ показал, что многообразие генов во всех доступных геномах *Methylococcus* представлено 4485 кластерами, 52 % которых присутствуют в геномах всех штаммов, что говорит о высокой консервативности геномов представителей рода *Methylococcus*. Культивирование новых изолятов в проточном режиме в модельных биореакторах показало, что ростовые параметры новых штаммов сравнимы или превышают таковые у *Mc. capsulatus* Bath. Высокие показатели роста и отсутствие в геномах полных последовательностей профагов указывают на перспективность новых изолятов рода *Methylococcus* для производства биопротеина из природного газа и позволяют использовать их в качестве объектов дальнейших работ по метаболической инженерии.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

АКТИНОБАКТЕРИИ РОДА *MYCOLICIBACTERIUM* КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОБНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕННЫХ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Доновна М. В., Стрижов Н. И., Ивашина Т. В., Довбня Д. В., Карпов М. В., Брагин Е. Ю.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр
биологических исследований», г. Пушкино
donova@ibpm.pushchino.ru; mv_donova@rambler.ru

Микробиологическая трансформация природных стероидов в настоящее время является технологической основой промышленного производства стероидных и других изопреноидных соединений, из которых далее с помощью комбинированных химико-микробиологических синтезов производят широкую номенклатуру востребованных в фармацевтике, пищевой промышленности и ветеринарии препаратов, включая кортикоиды, нейростероиды, половые гормоны, желчные кислоты и другие терпеноидные липиды.

Быстрорастущие сапротрофные актинобактерии рода *Mycolicibacterium*, такие как *M. neoaurum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* эффективно метаболизируют природные стероиды благодаря наличию эффективных систем транспорта гидрофобных субстратов, полиферментных систем стероидного катаболизма, высокой метаболической пластичности. Модификация основного катаболического пути актинобактерий, так называемого 9(10)-секопути деградации стероидов, позволяет не только улучшить биокаталитические свойства промышленных штаммов за счет подавления нежелательных активностей, приводящих к образованию побочных продуктов, но и перенаправлять метаболические потоки в клетке в сторону образования целевых стероидных продуктов.

Так, делеция в гене *kstD*, кодирующем 3-кетостероид-1-дегидрогеназу, у штамма *M. neoaurum* NRRL B-3805, приводит к снижению нежелательного образования андростадиендиона (АДД) и других 1-дегидростероидов при получении андростендиона (АД). Нокаут гена *fadD3* у штамма *M. smegmatis* mc² 155 способствует накоплению ценных соединений инданового ряда, востребованных в синтезе прогестинов. Инактивация гена *fabG* у *M. neoaurum* и его производных позволяет эффективно получать ценные C₂₂-стероиды, такие как 20-гидроксиметилпрегненон.

Перспективным направлением является создание на основе гетерологической экспрессии чужеродных систем стероидогенеза трансгенных миколицибактерий, обеспечивающих селективное образование востребованных соединений из фитостероидов в одну биотехнологическую стадию. Так, ко-экспрессия генов 17β-гидроксистероиддегидрогеназы гриба *Cochliobolus lunatus* и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis* в клетках *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816Д обеспечивает эффективную продукцию мужского полового гормона тестостерона из фитостерина. Экспрессия генов начального этапа стероидогенеза коры надпочечников быка в составе трицистронного оперона (CYP11A1-Ad-AdR) в клетках *M. smegmatis* позволяет получать высоковольтребованный гормон – прогестерон в одну биотехнологическую стадию из холестерина.

Результаты, представленные в докладе, свидетельствуют о высоком потенциале миколицибактерий как платформы для создания эффективных промышленных продуцентов востребованных стероидных соединений.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 21-64-0024).

БИОСУРФАКТАНТЫ: СТРУКТУРА, МЕХАНИЗМЫ СИНТЕЗА, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Куюкина М. С.^{1,2}, Криворучко А. В.^{1,2}, Ившина И. Б.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, kuyukina@iegm.ru

²Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь,

В мире отмечается стабильный интерес к поверхностно-активным веществам биогенного происхождения (биоПАВ, биосурфактантам) как экологически безопасным и экономически эффективным альтернативам синтетических ПАВ, отличающимся низкой токсичностью, улучшенными функциональными характеристиками и возможностью получения из возобновляемого сырья.

Согласно данным Global Market Insight Inc., с 2021 по 2026 гг. ожидается ежегодный 4,6 %-ный рост глобального рынка микробных биосурфактантов промышленного, сельскохозяйственного и медицинского назначения. Пандемия коронавирусной инфекции спровоцировала резкое увеличение спроса на продукцию биосурфактантов для использования их в качестве моющих, чистящих и гигиенических средств. Сегодня хорошо изучены гликолипидные биосурфактанты (рамнолипиды псевдомонад, маннозилэритритол- и софоролипиды дрожжей), интенсивно исследуются трегалолипиды, синтезируемые актинобактериями из группы миколат. Ди- и мономиколаты трегалозы первоначально были обнаружены у патогенных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*, *Corynebacterium diphtheriae*, что ограничивает использование их биотехнологического потенциала.

Нами на основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmsol>) выявлены непатогенные штаммы *Rhodococcus* spp., способные синтезировать трегалолипидные биосурфактанты с эмульгирующей, солюбилизующей, иммуностропной и антиадгезивной активностью. Получены препараты различной степени очистки, пригодные для дифференцированного экобиотехнологического и медицинского применения. Установлена низкая токсичность *Rhodococcus*-биосурфактантов по сравнению с другими микробными глико-

липидами (в частности рамнолипидами), а также синтетическими аналогами. В результате секвенирования геномов штаммов *R. erythropolis* ИЭГМ 267 и *R. ruber* ИЭГМ 231 выявлены ключевые ферменты и разработаны способы расширения функциональных возможностей *Rhodococcus*-биосурфактантов.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (18-14-00140) и Российского фонда фундаментальных исследований (20-44-596001).

ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ВИНОДЕЛИИ, С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНЫХ, ТРАНСКРИПТОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ПОДХОДОВ

Марданов А. В.¹, Белецкий А. В.¹, Танащук Т. Н.², Кишковская С. А.², Шаламитский М. Ю.², Равин Н. В.¹,

¹ Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, mardanov@biengi.ac.ru

² Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Ялта,

Виноделие – это многостадийный процесс, протекающий с участием как эндогенной микрофлоры ягод винограда, так и вносимых селекционных культур дрожжей, в основном *Saccharomyces cerevisiae*. В зависимости от региона и технологии производства вина используют различные селекционные штаммы дрожжей, отличающиеся физиологическими и генетическими характеристиками. Особыми свойствами обладают штаммы дрожжей, используемые при приготовлении вин типа Херес. Эти штаммы способны расти в виде пленки на поверхности сброженного виноматериала, при этом их метаболизм переключается с ферментативного на окислительный. Результаты сравнительных геномных исследований показали, что хересные штаммы представляют отдельную линию винных дрожжей, отделившуюся сравнительно недавно и прошедшую «бутылочное горлышко» отбора в процессе длительной доместикиации.

Объектами исследования являлись промышленно ценные штаммы винных дрожжей из коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»). Мы просеквенировали геномы используемых в виноделии в России винных и хересных штаммов дрожжей из разных географических регионов. Сравнительный анализ геномов винных и хересных дрожжей показал, что все хересные штаммы, образуют отдельный кластер в группе винных дрожжей. В результате полногеномного анализа выявлено 2270 характерных для хересных штаммов однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в 1337 локусах. Специфические для хересных штаммов SNP были найдены в генах, продукты которых существенны для морфологии клетки, миотического цикла, гомеостаза ионов, ДНК репарации, метаболизма углеводов и липидов, биогенеза клеточной стенки. Пангеномный анализ выявил несколько «не рефересных» локусов, которые, вероятно, важны для винных штаммов. Проведен анализ транскриптома и протеома хересного штамма I-329 на разных стадиях винодельческого процесса и развития хересной пленки. Показано, что данные GO и KEGG-анализа протеома коррелируют с данными транскриптомного анализа, выявившего на стадии зрелой пленки индукцию генов, участвующих в реакции на различные стрессы, окислительном метаболизме, высокоаффинном транспорте сахаров, утилизации глицерина, метаболизме серы, контроле качества и рециркуляции белков, биогенезе клеточной стенки, апоптозе. Полученные результаты дают новую информацию о генетическом разнообразии винных и хересных дрожжей и их адаптации к специфическим условиям виноделия.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К УПРАВЛЕНИЮ АНАММОКС-СООБЩЕСТВОМ (ГЕНЕТИЧЕСКИЙ, МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ УРОВНИ)

Николаев Ю. А., Марданов А. В., Грачев В. А., Берестовская Ю. Ю.,
Каллистова А. Ю., Равин Н. В., Пименов Н. В.*

ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, NikolaevYA@mail.ru

Самой молодой и эффективной технологией удаления азота из стоков является Анаммокс-технология. Полноценное и эффективное удаление азота через Анаммокс-процесс (АМП) может быть реализовано только сообществом бактерий, основу которого составляют - нитрификаторы и анаммокс-бактерии. Целью исследования было разработать методические подходы по управлению анаммокс-сообществом, определить метаболиты, важные для функционирования анаммокс-сообщества, экспериментально испытать влияние токсикантов и интродукции определенных микроорганизмов на эффективность АМП.

В работе использовали методы: физического моделирования процесса Анаммокс на специально созданной установке из трёх параллельно работающих биореакторов, метагеномного анализа состава сообщества и геномов доминирующих организмов методами высокопроизводительного секвенирования, световой, люминесцентной и электронной микроскопии.

Анализ метагенома анаммокс-сообщества позволил вычленивать фолат и формиат, как два важных метаболита, необходимые для роста анаммокс-бактерий. На фоне увеличения нагрузки по аммоний в 2 раза (как стрессора) формиат (75 мг/л) и фолат (0,2 мг/л) повышали эффективность процесса на 10–15 % и в 2 раза ускоряли адгезию активного ила на пористом носителе. Следовательно, формиат и фолат могут быть использованы для повышения стабильности и эффективности функционирования анаммокс-биореакторов очистки сточных вод.

Проведены исследования влияния разных концентраций сероводорода на активность АМП, поскольку известно, что H_2S является сильным ингибитором процесса нитрификации и часто присутствует в сточных водах. Выявлено снижение активности нитрификаторов второй группы уже при содержании H_2S 5 мг/л, нитрификаторов первой группы – 25 мг/л, анаммокс-бактерии не реагировали на H_2S до концентрации 100 мг/л.

Показано, что дополнительное внесение бактерий-нитрификаторов в действующий биореактор с анаммокс-сообществом повысило эффективность удаления азота в три раза.

Исследование метагенома анаммокс-сообщества на разных этапах культивирования выявило наличие постоянно присутствующих гетеротрофных спутников. Обсуждается их возможная роль в анаммокс-сообществе. Был полностью собран и аннотирован геном анаммокс-бактерий порядка Brocadiales, доминирующих в наших лабораторных биореакторах.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-08008).

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА В ЗДОРОВЬЕ И ПАТОЛОГИИ

Ильина Е. Н.

Микробиота кишечника представляет собой густонаселенную сбалансированную экосистему, принимающую участие в реализации ряда важных функций организма-хозяина, а именно переваривании пищи и защите от патогенных микроорганизмов посредством усиления барьерной функции кишечного эпителия, развитию и модуляции врожденного иммунитета. Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования совершило революцию в изучении кишечной микробиоты и позволило описать бактериальный состав в норме и при развитии патологического процесса. ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России выступает пионером в исследованиях кишечной микробиоты в России. В сотрудничестве с ведущими отечествен-

ными гастроэнтерологами впервые была охарактеризована микробиота здорового населения Российской Федерации, и показаны отличия между микробиотой сельского и городского населения. Сегодня в рамках консорциума проведены работы по изучению микробиоты кишечника при ХОБЛ, болезни Паркинсона, рассеянном склерозе, эрадикации *H. pylori*, алкоголизме. На фоне неконтролируемого использования антибиотиков, особенно сейчас в терапии новой коронавирусной инфекции, актуальными становятся исследования резистомы кишечной микробиоты и нахождение способов его коррекции. Сегодня существуют различные способы коррекции микробиоты, среди которых наиболее эффективным является трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ). Процедура ТФМ заключается в введении с помощью эндоскопа, колоноскопа или перорально (капсулы) в организм пациента микробиоты, полученной от здорового донора. Применение ТФМ приводит к снижению представленности патогенов с множественной резистентностью к антибиотикам, что крайне важно на фоне растущей смертности по причине инфицирования резистентными к антибиотикам патогенными бактериями. На данный момент у мирового научного сообщества не сформировалось четкого понимания механизмов, обуславливающих высокую терапевтическую эффективность ТФМ. Тщательная расшифровка комплексного механизма воздействия ТФМ на организм реципиента весьма актуальна как с точки зрения решения фундаментальных задач по изучению взаимодействий между микробиотой кишечника и организмом хозяина, так и с практической точки зрения. Фекальная трансплантация может стать основой целого семейства биомедицинских технологий (например, разработки пробиотических препаратов нового поколения), а понимание механизмов ее действия критически важно для качественного развития методов лечения заболеваний, ассоциированных с угнетением нормальной микрофлоры кишечника.

ГИПОБИОЗ БАКТЕРИЙ: МЕХАНИЗМЫ, МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ

Капрельянц А. С.

*Институт биохимии им. А. Н. Баха,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,
Москва, arseny@inbi.ras.ru*

Гипобиоз – явление присуще широкому кругу неспорулирующих бактерий как ответ на воздействие стрессовых факторов окружающей среды. В состоянии гипобиоза (покоя) бактериальная клетка может пребывать при существенно сниженной метаболической активности и без признаков деления длительное (до нескольких и более лет) время. Подобное состояние патогенных для животных и человека бактерий является источником ряда трудно распознаваемых очагов инфекций в окружающей среде. В тоже время, длительное пребывание возбудителя в неактивном состоянии в организме хозяина (человека) в виде покоящихся форм (ПФ) приводит к возникновению дремлющих инфекций таких как латентный туберкулез- асимптоматическое заболевание, которое затрагивает до 1/4 популяции человечества.

Моделирование образования покоящихся форм *M.tuberculosis* (МТБ) в лабораторных условиях позволили изучить такие формы с помощью современных методов анализа. Важно, что лабораторные «дремлющие» формы способны вызывать активный туберкулезный процесс у животных.

Методы транскриптомики, протеомики и метаболомики и традиционной биохимии обнаруживают существенные изменения в бактериальной клетке при переходе в покоящееся состояние. Эти изменения состоят в глобальном снижении содержания транскриптов белок-кодирующих генов, что, возможно, связано с активацией систем токсин-антитоксин, приводящей к дегградации мРНК. Глобальным фактором, снижающим уровень трансляции в ПФ является гидролиз 23S рибосомальной РНК. Очевидно, что практически полное отсутствие этих и других биосинтетических процессов в ПФ является причиной резистентности ПФ к основным, применяемым в клинике, антитуберкулезным соединениям.

Несмотря на низкий уровень транскрипции и трансляции, протеомный анализ выявляет достаточно большой, хотя и модифицированный, набор белков в ПФ микобактерий. Этот набор представлен рядом ферментов центрального метаболизма, ферментов и белков, осу-

ществляющих защиту от окислительного стресса и агрегации белков, а также стабилизирующих нуклеиновые кислоты. Данные протеомного, метаболомного и биохимического анализа позволяют сформулировать гипотезу о протекании «минимального метаболизма» в стабилизированной и хорошо защищенной ПФ при отсутствии деления.

Реактивации ПФ микобактерий является многоступенчатым процессом, начальным звеном в которой является гидролиз запасенных в ПФ веществ, восстановление мембранного потенциала, повышение уровня цАМФ, постепенная «мозаичная» активация отдельных звеньев метаболизма, восстановление транскрипции. На более поздних этапах реактивации, перед запуском деления клеток, происходит перестройка клеточной стенки с участием белков семейства Rpf.

В работе использованы результаты, полученные при поддержке Российского Научного Фонда (грант 19-15-00324).

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

Припутневич Т. В., Гордеев А. Б., Любасовская Л. А., Мелкумян А. Р.

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова, Москва, priput1@gmail.com.

Доклад посвящен формированию и развитию медицинской микробиологии – новой, комплексной специальности, включающей в себя вирусологические, серологические, паразитологические, бактериологические и молекулярно-генетические методы исследования. В течение долгого времени медицинская микробиология, использующая для решения поставленных задач диагностики, профилактики и лечения инфекций человека огромное количество разнообразных методик (микроскопия, культуромика бактерий, грибов, вирусов, молекулярно-генетические и серологические методы), была разбита на отдельные куски по принципу методологии: микроскопия – паразитология, культивирование бактерий и грибов – бактериология и микология, вирусов – вирусология, ПЦР диагностика – молекулярная биология. Эти разрозненные части стали лишь разделами клинической лабораторной диагностики, утратив целостность науки медицинской микробиологии. В настоящее время ряд факторов, таких как ситуация с SARS-CoV-2, смертность от которой в основном связана с бактериальными осложнениями вирусной пневмонии на фоне ИВЛ, показал, насколько необходима целостность медицинской микробиологии, объединяющей вирусологию, серологию, бактериологию, молекулярную биологию в единую специальность. Эффективность оказания медицинской помощи при инфекционных заболеваниях от тестирования на вирусы и диагностики состояния иммунитета до диагностики бактериальных осложнений, вызванных полирезистентными штаммами бактерий, требует целостной системы с единым стандартным подходом. В связи с этим назрела необходимость объединить все указанные выше методы в единую специальность «медицинская микробиология». Это даст возможность подготовки полноценных специалистов, владеющих всеми (а не узкоспециализированными) методами диагностики инфекций у человека и имеющих целостное представление об инфекциях и иммунитете для выбора рационального метода диагностики из широкого арсенала существующих методик.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ: РОЛЬ В ХРОНИЧЕСКОМ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ И ПОИСК СРЕДСТВ БОРЬБЫ С НИМИ.

Романова Ю. М.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, genes2007@yandex.ru

До создания вакцин и антибиотиков человечество страдало от эпидемий острых инфекционных заболеваний, уносивших жизни миллионов людей. Однако, и в наши дни отмеча-

ется тенденция к росту удельного веса инфекций в общей структуре заболеваемости. Растет количество случаев хорошо известных инфекций, описаны новые инфекционные заболевания. Значительная их часть приходится на долю хронических инфекций, причем более половины — у людей с ослабленной иммунной системой, у которых заболевания вызываются инфекционными агентами, вполне обычными для окружающей среды человека. Установлено, что одним из механизмов хронического инфекционного процесса является образование бактериями биопленок. Хронические инфекции характеризуются длительной и прогрессирующей патологией, также вызванной воспалительной реакцией иммунной системы вокруг биопленки. Несмотря на распространенность инфекций, вызванных биопленками, их трудно диагностировать и лечить, и в настоящее время нет конкретных инструкций для врачей и клинических микробиологов по выявлению таких инфекций. В докладе представлены данные о методах изучения биопленок и различного рода хронических инфекциях, связанных со способностью бактерий образовывать биопленки. Одной из наиболее значимых медицинских проблем, обусловленных способностью бактерий формировать биопленки, являются инфекции мочевых путей (ИМП). При ИМП отмечается высокий уровень рецидивов инфекции, которая принимает характер хронической с частыми обострениями. На инородных телах — катетерах, дренажах, камнях — микроорганизмы формируют сложные биопленки, что приводит к развитию «катетер-ассоциированной ИМП».

В течение более полувека традиционные методы лечения инфекционных заболеваний основывались на применении антимикробных препаратов, вызывающих гибель или подавление роста бактерий. Однако эти методы становятся все менее эффективными из-за широкого распространения генов, контролирующих лекарственную устойчивость, среди бактерий, а также из-за повышенной резистентности к препаратам бактерий, образующих биопленки. В докладе представлены данные о механизмах повышенной устойчивости бактерий в биопленках к антимикробным препаратам и факторам иммунной защиты организма.

В связи с этим возникла необходимость разработки новых терапевтических подходов к лечению бактериальных инфекций, выросшая в глобальную проблему, требующую быстрого решения. В докладе будут представлены новейшие данные о поиске подходов к ингибированию процесса образования биопленок.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ КОРОНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЕЕ ВАКЦИННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

Суворов А. Н.

alexander_suvorov1@hotmail.com

Коронавирусная инфекция вызванная SARS-Cov-2 стала крупнейшей мировой эпидемией за последние 100 лет, к которой человечество оказалось совершенно неготовым. Не было ни средств терапии, ни способов эффективной вакцинной профилактики. Эпидемический штамм вируса, появившийся в Китае, за короткое время распространился по всему земному шару, вызвав заболевание у существенной части населения, причем в высоком проценте случаев наиболее сильно пострадали люди пожилого возраста с хроническими заболеваниями. В условиях пандемии разработка способов контроля инфекции, терапевтических подходов и вакцинной профилактики проводилась авральным способом с прямым участием органов государственной власти и ведущих научно-исследовательских лабораторий мира. Это позволило в беспрецедентно короткие сроки создать и зарегистрировать новые вакцины, созданные на основании подходов, никогда ранее не использовавшихся в практике здравоохранения. Сейчас, когда большая часть человечества провакцинирована новыми вакцинами, человечество находится в стадии анализа глобального эксперимента, результатом которого должно стать заключение о успешности тех или иных подходов к вакцинации, целесообразности и сроках ревакцинации созданными вакцинами. Параллельно разрабатываются другие вакцинные препараты, основанные на формировании иммунитета на слизистых с целью защиты от возбудителя в воротах инфекции. В ФГБНУ «ИЭМ» разрабатывается вакцина на основе

бактериальных пробиотических штаммов энтерококков с введенными в геном бактерий генов коронавируса. В докладе будут представлены данные результатов вакцинации созданными вакцинными кандидатами лабораторных животных.

ПОДХОДЫ К НОРМАЛИЗАЦИИ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

Тикунова Н. В., Морозов В. В., Тикунов А. Ю., Швалов А. Н., Бардашева А. В.,
Шрайнер Е. В., Морозова В. В., Власов В. В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск,
tikunova@niboch.nsc.ru

Микробиота кишечника человека – это динамическая система, находящаяся под воздействием организма хозяина и внешних факторов. Одним из способов воздействия на микробиоту кишечника является феко-трансплантация (ФТ) – введение кишечной микробиоты от здорового донора в кишечный тракт пациента. В ряде стран этот метод используется для нормализации микробиоты кишечника, в основном, при хронических воспалительных заболеваниях кишечника. В РФ несколько лет ведутся пилотные исследования эффективности ФТ при язвенном колите (ЯК), начатые в Новосибирске. Цель исследования – сравнить кишечный микробиом пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК) и ЯК и здоровых доноров (ЗД), а также оценить изменение микробиома кишечника пациентов с ЯК после однократного проведения ФТ.

Основной метод – сравнение 16S рНК профилей библиотек, созданных на основе образцов, полученных от доноров и пациентов с СРК и ЯК (до и после ФТ) и секвенированных на платформе Illumina MiSeq.

Результаты показали, что отношение Firmicutes/Bacteroidetes в выборках СРК и ЯК меньше, чем в выборке ЗД; в выборках СРК и ЯК больше доля последовательностей Bacteroidetes и Proteobacteria, и меньше доля последовательностей класса Clostridia, а также семейства Ruminococcaceae, но не Erysipelotrichaceae.

У пациентов с ЯК после ФТ произошло увеличение биоразнообразия 16S рНК профилей. Доля последовательностей Firmicutes уменьшилась, а Proteobacteria – увеличилась, причем в большинстве случаев после ФТ резко сократилась доля последовательностей патогенных представителей Firmicutes и Proteobacteria (*Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *St. maltophilia*, *Streptococcus* spp.). После ФТ на порядок повысилась доля последовательностей *Lactobacillus* spp., и существенно расширился их видовой состав. Можно сделать предварительный вывод о том, что однократная процедура ФТ может привести к повышению биоразнообразия микробиоты пациентов и оптимизации ее таксономического состава.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 21-14-00360

СЕКЦИЯ: РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГЛИНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ И ЕГО РОЛЬ В ЭВОЛЮЦИИ ИНЖЕНЕРНЫХ БАРЬЕРОВ БЕЗОПАСНОСТИ

Абрамова Е. С.¹, Попова Н. М.¹, Сафонов А. В.¹

¹ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва,
alexeysafonof@gmail.com

В качестве перспективного материала для использования в инженерных барьерах безопасности (ИББ) при захоронении высокоактивных радиоактивных отходов в глубинных геологических формациях выбраны глины. Глинистые материалы с высоким содержанием монтмориллонита рассматриваются для использования в будущем пункте глубинного подземного захоронения радиоактивных отходов Нижнеканском гнейсовом массиве (НКМ) «Енисейский» (г. Железногорск Красноярского края). Долговременное хранение радиоактивных отходов требует учет факторов, влияющих на безопасность хранилища. Одним из таких факторов является биогенное и биогенно-опосредованное воздействие на материалы ИББ. Причем глина сама может являться источником микробиоты, а также выступать в роли донора биогенных элементов для роста аборигенных микроорганизмов.

В данной работе изучено микробное разнообразие глинистых материалов, произведена оценка степени воздействия микробиоты на эволюцию ИББ.

На основании анализа данных филогенетического разнообразия 16S рРНК проб глин бентонитового и каолинового типов обнаружены микроорганизмы, преимущественно бройдильного типа метаболизма, а также способные использовать сульфат и железо в качестве акцепторов электронов. Найдена корреляция между возможными процессами, протекаемыми при благоприятных условиях, и его влиянием на эволюцию ИББ. Установлено, что стимулирование роста наблюдалось при добавлении продуктов радиолиза, продуктов коррозии стали и микробных газов. Проведена оценка интенсивности выщелачивания основных структурных элементов глинистых минералов (алюминия и кремния), а также накопления сероводорода, который играет важную роль в безопасности металлических и цементных материалов в ИББ.

СИСТЕМА ЦИАНОБАКТЕРИЙ: ЛОГИКА И НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ РАЗНООБРАЗИЯ

Аверина С. Г., Пиневиц А. В.

С.-Петербургский государственный университет, С.-Петербург, s.averina@spbu.ru

Несмотря на фатальную зависимость от двух таксономий и двух кодексов (ICNP и ICN), система цианобактерий эволюционирует, обещая стать полноценной частью системы прокариотов. В этом актуальность сообщения, цель которого — охарактеризовать status quo; оценить достижения; привести примеры персонального участия авторов.

Целям систематики цианобактерий служат разнообразные методы: изолирование штаммов методами культуромикки; метагеномный анализ; использование критериев фено- и генотипической идентификации.

Каркасом системы может быть только 16S-филогения и геномное секвенирование. Однако до сих пор рабочей основой и источником компромисса с ботанической системой при классификации неархаичных crown-цианобактерий служат формальные рода (form-genus; термин ICN для таксона, место которого в таксоне более высокого ранга неизвестно), распределенные по 5 морфогруппам, эквивалентным ботаническим порядкам. Такая система чаще всего противоречит классификации на филогенетической основе, и уйти от нее необходимо, тем более что новые результаты анализа разнообразия цианобактерий выходят за ее рамки.

К достижениям прежде всего относится описание нефотосинтезирующих цианобактерий классов *Melainobacteria*, *Sericocytochromatia*, *Margulisbacteria* и *Saganbacteria* [1], которые прогнозировались ранее [2]. Они были выделены более 30 лет назад, но тогда не идентифицировались как таковые [3]. Другое достижение – обособлен архаичный класс *Gloeobacteria* (фотосинтезирующие цианобактерии без тилакоидов) [4].

С использованием нестандартного критерия (образование хлорофиллов *d* и *f*, поглощающих свет > 700 нм) описан новый род crown-цианобактерий с видом *Altericista variichlora* [5]. Составлен диагноз нового вида *Geminocystis ruthenica* [6] из слабо дифференцируемой группы цианодиплококков.

Исследование поддержано грантом РФФИ 20-04-00020.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ДОННЫХ ОСАДКОВ И МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЦИКЛОВ УГЛЕРОДА, СЕРЫ И АЗОТА В БАРЕНЦЕВОМ МОРЕ

Бегматов Ш. А., Белецкий А. С., Кадников В. В., Марданов А. В., Пименов Н. В.,
Равин Н. В., Саввичев А. С.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, shabegmatov@gmail.com

Биогеохимические циклы ключевых биогенных элементов в Арктических морях заметно отличаются от других морских экосистем. Цель работы – характеристика микробиологических процессов и микробных сообществ донных осадков северной части Баренцева моря. Объектами исследования были донные осадки, отобранные на 5 станциях. Общая численность микроорганизмов в верхних слоях осадков (0–5 см) составляла $1-2 \times 10^6$ кл см⁻³, в глубинных (до 19 см) – от 0.4 до $0,6 \times 10^6$ кл см⁻³. Содержание метана в верхних слоях составляло от 0,7 до 3 мМ и увеличивалось с глубиной до 10 мМ. Скорость окисления метана в поверхностных слоях варьировала от 2 до 23 нмоль/дм³ сут и уменьшалась до 0.3 нмоль/дм³ сут на глубине 16–19 см. Этот показатель коррелировал с интенсивностью темновой ассимиляции углекислоты. Метаногенез во всех образцах не удалось достоверно зарегистрировать радиоизотопным методом.

Молекулярный анализ микробных сообществ по генам 16S рРНК выявил микроорганизмы, участвующие в трансформациях серы, азота и метана. В верхних слоях значительную долю сообществ составляли кренархеи семейства *Nitrosopumilaceae* (9–40 % последовательностей 16S рРНК), окисляющие аммоний, последующее окисление нитрита до нитрата может осуществляться бактериями *Nitrospira*. Известные линии метаногенных архей не обнаружены, что согласуется с низкой интенсивностью метаногенеза. В глубинных слоях осадков обнаружены археи групп ANME-2a-2b и ANME-2c, которые могут анаэробно окислять метан. Известные виды аэробных метанотрофных бактерий не были обнаружены; вероятно, окисление метана в верхних слоях осадка осуществляется некультивируемыми линиями альфа- и гамма-протеобактерий. Обнаружены метилотрофы семейств *Methyloligellaceae* и *Hyphomicrobiaceae*, образующие синтрофные ассоциации с метанотрофами. Сульфат-редуцирующие дельта-протеобактерии обнаружены преимущественно в глубинных слоях осадков (до 17 % сообщества), в которых наблюдалась интенсивная сульфат-редукция (до 2 мкмоль/дм³ сут). Образующийся сульфид может окисляться бактериями рода *Sulfurovum* (филум *Campilobacterota*), восстанавливающими нитрат до N₂.

Таким образом, в донных осадках происходит аэробное и анаэробное окисление метана, вероятно, поступающего из более глубоких горизонтов. Цикл серы связан с анаэробным окислением метана и циклом азота, который включает окисление аммония до нитрата в аэробной зоне и сопряженную с окислением сульфида денитрификацию.

МИНЕРАЛЬНЫЕ ПОДЗЕМНЫЕ ВОДЫ КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ И ИСТОЧНИК ВЫДЕЛЕНИЯ НОВЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ И ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ «РАЗРЕЖЕННОЙ БИОСФЕРЫ»

Гаврилов С. Н.¹, Маслов А. А.², Клюкина А. А.¹, Меркель А. Ю.¹, Заварзина Д. Г.¹

¹Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Геологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Месторождения питьевых минеральных подземных вод представляют собой один из наиболее ценных и востребованных природных ресурсов. Решение проблем генезиса и сохранения этих ресурсов при их эксплуатации невозможно без оценки биогеохимической активности микробных сообществ, населяющих подземную гидросферу. Характеристика микробных сообществ водоносных горизонтов зоны активного водообмена важна для понимания функционирования подземных биоценозов, в целом, так как эти экосистемы гидравлически открыты, и формирование их естественных ресурсов идёт, в том числе, при участии атмосферных осадков, т. е. во взаимодействии с поверхностной биосферой. Предположения о значительном влиянии микроорганизмов на состав минеральных подземных вод возникли на протяжении всей истории изучения их генезиса, но микробиологические исследования в этой области до сих пор были фрагментарны.

Наша работа посвящена характеристике микробных сообществ минеральных вод, добываемых на Ессентукском месторождении. Профилирование по гену 16S рРНК микробных сообществ вод шести скважин, вскрывающих различные водоносные горизонты, выявило их существенные отличия друг от друга по филогенетическому составу, что говорит об изолированности эксплуатируемых горизонтов месторождения. В то же время, все исследованные микробные сообщества имели ряд общих характерных черт. В каждом из них преобладали филотипы, не имеющие культивируемых представителей, например, археи филума *Nadarchaeales*, или актинобактерии новых семейств и классов. Значительную долю разнообразия составляли филотипы, культивируемые представители которых способны к автотрофному метаногенезу или ацетогенезу, либо к внеклеточному переносу электронов. Широкое разнообразие последних было выявлено среди минорных компонентов сообществ, каждый из которых составлял менее 1 % всей популяции. Общий вклад таких малочисленных популяций в геохимическую активность сообществ может быть существенным. Нам удалось подтвердить это предположение, выделив чистые культуры микроорганизмов двух «микроразнообразий» – железоредукторов р. *Deferribacter* и железоокисляющих бактерий р. *Halothiobacillus*.

Нами были получены чистые культуры доминирующих филотипов – архей р. *Methanothermobacter* и актинобактерий филотипа ОРВ41 класса *Coriobacteriia*. Каждый из этих организмов может оказывать существенное влияние на состав вод и водовмещающих пород, осуществляя метаногенез и железоредукцию, соответственно. Геном представителя ОРВ41 был секвенирован и аннотирован, его дальнейший детальный анализ позволит пролить свет на метаболизм новой культивируемой группы прокариот. В целом, полученные данные создают основу для дальнейшего подробного изучения микробиологического фактора в генезисе минеральных подземных вод.

МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ СОДОВЫХ СОЛОНЧАКОВ КУЛУНДИНСКОЙ СТЕПИ

Георгиева М. Л.^{1,2}, Биланенко Е. Н.¹, Бондаренко С. А.^{1,3}, Кокаева Л. Ю.¹, Понизовская В. Б.¹, Куварина А. Е.², Гаврюшина И. А.², Садыкова В. С.²

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва,
info@mail.bio.msu.ru

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе», Москва, instna@sovintel.ru

³ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,
Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, Москва, inmi@inmi.ru

Среди засоленных биотопов наиболее экстремальными считаются содовые озера и окружающие их солончаки. В них, помимо высоких общих концентраций солей наблюдаются также высокие значения рН и щелочности. На территории России содовое засоление почв встречается довольно редко и приурочено к побережьям содовых озер. Исследования эукариот, обитающих в подобных условиях, значительно уступают изучению прокариот. Однако благодаря развитию методов выделения и культивирования грибов-экстремофилов начали накапливаться данные о щелочеустойчивых грибах. Целью работы было изучение разнообразия и особенностей экофизиологии мицелиальных грибов, обитающих на побережье содовых озер Кулундинской степи (Алтайский край, Россия).

Материалом для работы послужили образцы почв, отобранные в разные годы (2003, 2005, 2010, 2011, 2017, 2020) на побережье различных содовых озер Кулундинской степи (Петуховское, Живописное, Танатар и др.). Для выделения мицелиальных грибов из образцов почв использована селективная среда на щелочном буфере. Таксономическое положение изолятов грибов определено по морфолого-культуральным и молекулярно-генетическим признакам. Оценка антимикробной активности проведена методом блоков и дисков на различных тест-организмах.

Многолетние исследования позволили выделить и охарактеризовать основные особенности щелочеустойчивого сообщества грибов содовых солончаков Кулундинской степи. Видовое разнообразие микромицетов невелико, отмечены только аскомицеты из порядков: *Hydrocreales*, *Glomerellales*, *Pleosporales* и *Sordariales*. Представители нескольких таксонов (*Sodiomyces alkalinus*, *Emericellopsis alkalina*) имеют высокие показатели встречаемости и численности. Отмечены грибы с разными типами адаптации к рН, однако значительную часть микобиоты составляют алкалофильные изоляты. Высокая антифунгальная активность впервые выявлена у представителей сем. *Plectosphaerellaceae* (*Acrostalagmus luteoalbus*, *Chordomyces antarcticus*, *S. alkalinus*). Для 10 изолятов *E. alkalina* количественно оценено содержание комплекса новых антимикробных пептидов эмерициллипсидов А-Е и отобран перспективный штамм-продуцент.

Проведенное исследование демонстрирует присутствие в содовых солончаках довольно специфичной группы мицелиальных грибов, что открывает широкие перспективы не только для экологических работ по выявлению роли грибов в биотопе, но и имеет прикладное значение, поскольку эти грибы могут стать перспективными источниками ценных для человека соединений.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00992.

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПЕЩЕРЫ ШУЛЬГАН-ТАШ (БАШКОРТОСТАН)

Гоголева Н. Е.^{1,2}, Балкин А. С.^{1,3}, Червяцова О. Я.⁴, Бойцова М. Д.¹, Кузьмина Л. Ю.⁵,
Плотников А. О.³, Шагимарданова Е. И.², Гоголев Ю. В.^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН

²Казанский (Приволжский) федеральный университет

³Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

⁴ФГБУ «Государственный природный биосферный заповедник «Шульган-Таш»»

⁵Уфимский институт биологии УФИЦ РАН

Сообщества микроорганизмов, населяющих всевозможные биотопы, обеспечивают круговорот энергии и питательных веществ на Земле и имеют гигантское таксономическое, морфологическое, метаболическое, структурное и эволюционное разнообразие.

Особенный интерес представляют малоисследованные микробные консорциумы из труднодоступных и экстремальных местообитаний. К таким местам можно отнести пещеры,

а также почвенные и водные биотопы. Пещеры представляют собой особые биотопы, для которых характерными являются стабильные низкие температуры, повышенная влажность, скудность органических субстратов, отсутствие освещения. Невозможность производства органического вещества фототрофными организмами компенсируется богатством окислительно-восстановительных процессов. Первичная продуктивность в большинстве пещер связана с хемоавтотрофными и хемолитоавтотрофными бактериями и археями, в том числе актиномицетами – активными продуцентами антибиотиков. Однако не более 0,1 % микроорганизмов можно культивировать в лабораторных условиях, что затрудняет изучение разнообразия в природных биотопах. Современные технологии позволяют создавать профили сложных микробных сообществ, открывать и характеризовать новые организмы, которые ранее не могли быть обнаруженными, исследовать динамику микробных популяций в меняющихся условиях, определять метаболические особенности микробиомов. В данной работе с помощью методов высокопроизводительного секвенирования нами были исследованы микробные сообщества карстовой пещеры Шульган-Таш (Башкортостан), являющейся объектом культурно-исторического наследия. Были даны структурные и функциональные характеристики основных типов микробиомов. Выявлены особенности водной экосистемы подземного озера «Верхнее», сочетающей хемолитотрофов, участвующих в биогенезе минеральных отложений и хищников-фильтраторов в составе бактериальных матов. Выраженные антагонистические свойства членов микробных сообществ, развитые в условиях жесткой конкуренции за субстрат, способность к росту при низких температурах являются предпосылками выделения из пещерных микробиомов продуцентов новых антимикробных веществ и компонентов биопротекторных препаратов.

Эксперименты по секвенированию ДНК проведены при поддержке РФФ (проект №17-14-01363). Микробиологическая часть работы выполнена в рамках госзадания ФИЦ КазНЦ РАН.

MIRRI КАК ОБЩЕЕВРОПЕЙСКАЯ СИСТЕМА КОЛЛЕКЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

Евтушенко Л. И., Василенко А. Н, Озерская С. М.

Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ),
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина,
ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, evtushenko@ibpm.pushchino.ru

Наблюдаемый в последние годы импульс интереса к изучению и практическому использованию микробного разнообразия и его сохранению в коллекциях обусловлен рядом факторов, в их числе – удешевление и доступность современных методов исследований, новые открытия, лежащие в основе новых конкурентоспособных технологий, а также исчерпание накопленного ранее научного задела и новые вызовы. Масштаб и разнообразие задач, стоящих перед коллекциями микроорганизмов – уникальной инфраструктурой науки и биотехнологии – определяют необходимость их кооперации, в том числе на международном уровне. Примером такой кооперации может служить создание общеевропейской распределенной инфраструктуры исследований (Microbial Resource Research Infrastructure, MIRRI <https://www.mirri.org/>).

В настоящее время MIRRI объединяет 52 коллекции микроорганизмов из 10 стран Европы, в их числе российские коллекции – ВКМ, ВКПМ, ИЭГМ и UNIQEM (образующие Российский национальный узел MIRRI). В систему MIRRI могут войти любые микробные коллекции, ориентирующиеся в своей работе на международные стандарты во всех видах коллекционной деятельности.

Одной из основных задач MIRRI является предоставление научному сообществу и производителям уникальной возможности легитимного доступа к широчайшему спектру высококачественных биоматериалов (микроорганизмов и их производных) и разноплановой информации, касающейся биообъектов, экспертизы, регулятивов и т. д., а также к обширному и разнообразному набору сервисных услуг, выполняемых с использованием современной научно-методической базы и передового опыта партнерских организаций.

Продолжающиеся работы ВКМ по созданию единой информационной системы MIRRI (в рамках Проекта IS_MIRRI-21) включают, в том числе, комплектацию Единого каталога коллекций MIRRI (содержит в настоящее время более 140 000 штаммов микроорганизмов), разработку стратегии и механизмов связи каталожной базы данных MIRRI с различными базами данных Наук о жизни, сбор разрозненных данных по штаммам микроорганизмов из различных источников в мировом информационном пространстве микробиологии, биохимии, биоинформатики, биотехнологии, медицины, сельского хозяйства и т. д. Готовится к запуску система облачных технологий доступа к данным [в рамках проекта EOSC-Life (<https://www.eosc-life.eu/>) с участием 37 медико-биологических и биотехнологических инфраструктур Европы, включая MIRRI].

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ НЕФТЕРАЗЛАГАЮЩИЕ ПОЧВЕННЫЕ БАКТЕРИИ АНТРОПОГЕННО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Журавлева А. С.¹, Галушко А. С.¹, Андронов Е. Е.²

¹ФГБНУ АФИ, zhuravlan@gmail.com

²ВНИ ИСХМ

Проблемы антропогенного загрязнения почв, глобального изменения климата и связанные с этим изменения в составе почвенных микробных сообществ являются актуальными в настоящее время. Авторами была выведена гипотеза, что в поверхностном слое загрязненных почв могут создаваться условия, способствующие развитию термофильных микроорганизмов. Целью работы был поиск, выделение, изучение и идентификация термофильных бактерий антропогенно измененных почв и грунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области, с перспективой создания микробных консорциумов, наиболее эффективно разлагающих нефть.

Исследовали пробы почв со свалки и грунтов с полотна железной дороги, взятых в п. Кудрово, г. Пушкин и г. Луга. Массовую долю содержания нефтепродуктов в образцах определяли флуориметрическим методом. Бактерии культивировали при температуре 60 °С на модифицированной жидкой минеральной питательной среде Ворошиловой-Диановой с добавлением в качестве органического субстрата ацетата натрия либо нефти. Динамику роста культур определяли с помощью спектрофотометра ПЭ 3000-УФ (Промэколаб). Идентификацию штаммов молекулярно-генетическими методами проводили в компании «Евроген» (Москва). Анализ микробиомов образцов почв до рода проводили во ВНИ ИСХМ с помощью стандартных методов. Секвенирование полученных фрагментов гена 16S рРНК было проведено на приборе GS Junior компании Roshe методом пиросеквенирования.

Метагеномный анализ образцов грунтов г. Пушкин до рода показал изменения микробных сообществ при загрязнении нефтепродуктами. Так, в образцах с содержанием нефтепродуктов 1,9 и 2,7 % наблюдается выраженное возрастание количества представителей типа *Firmicutes* в 10 и 21 раз в сравнении с фоновым грунтом железной дороги, и в 6 и 12 раз – в сравнении с фоновой почвой на расстоянии 50 м от полотна.

Всего из исследуемых почвенных образцов было выделено 9 термофильных культур аэробных бактерий, использующих ацетат натрия и/или нефть в качестве субстрата для роста. Анализ сиквенсов генов 16SpРНК показал принадлежность штаммов к представителям разных родов грамположительных спорообразующих бактерий типа *Firmicutes* – роду *Geobacillus* и близкому к нему роду *Aeribacillus*, сравнительно недавно отделенному от геобацилл.

Сведения о присутствии в почвах регионов Санкт-Петербурга и Ленинградской области термофильных бацилл рода *Aeribacillus* получены нами впервые. Имеется довольно мало данных о присутствии в почвах на территории России бацилл рода *Geobacillus*, таким образом, получены новые сведения о распространении этих бактерий на территории России и в северных регионах, в частности. Выявлено, что нетипичные для северных регионов представители термофильных бацилл с их быстрым метаболизмом могут выживать на поверхности

антропогенно измененных почв и грунтов, используя для размножения краткий период повышенных температур и пережидая неблагоприятные периоды в состоянии спор.

Результаты исследования позволяют получить новую информацию о термофильных представителях микробных сообществ северных регионов, способных к разложению сложных органических соединений.

Работа проведена при частичной поддержке РФФИ (грант № 19-34-90156).

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА КАРОТИНОГЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

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

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет

*e-mail: annakublanovskaya@gmail.com

Каротиногенные микроводоросли способны накапливать вторичные каротиноиды в клетках в значительных количествах. Данные организмы в большинстве случаев сосуществуют в сообществах с бактериями. Оценка качественного и количественного состава бактериального компонента таких сообществ необходима для создания устойчивых и высоко продуктивных альго-бактериальных сообществ. Целью данного исследования было исследование микробиома четырех штаммов каротиногенных микроводорослей, полученных из разных регионов.

Были исследованы штаммы *Haematococcus lacustris* IPPAS H-2018, *Bracteacoccus aggregatus* IPPAS C-2045 (выделены на побережье Белого моря в 2014 и 2015 гг.) и новые изоляты 2020 года *Coelastrella rubescens* NAMSU R1 (д. Расторгуево, МО, Россия) и *S. oocystiformis* NAMSU C1 (залив Джорджиан, Канада). Оценка морфо-структурных особенностей фикосферы водорослей проводили с помощью методов светлопольной и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ); таксономический анализ бактериального компонента сообществ исследовали с помощью 16S рПНК-метабаркодинга.

Анализ методами микроскопии культур микроводорослей *H. lacustris* и *B. aggregatus*, длительно пребывающих в условиях лабораторного культивирования, показал наличие клеток бактерий с апикальным и горизонтальным прикреплением, в то время как новые штаммы рода *Coelastrella* характеризовались только апикальным прикреплением бактерий. При оценке таксономического состава было отмечено наличие значительного сходства между составом микробиома двух новых штаммов *S. rubescens* и *S. oocystiformis*, полученных из разных регионов. На вегетативной стадии культивирования отмечено наличие трех общих семейств для всех культур (*Rhodobacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Caulobacteraceae*) и 17 общих семейств для штаммов *H. lacustris* и *B. aggregatus*. Отмечено 4 общих рода для всех культур микроводорослей: *Brevundimonas*, *Paracoccus*, *Devosia* и *Bacillus*. Показано, что из общих родов только р. *Devosia* не был обнаружен в контрольных пробах (лабораторная контаминация и штамм микроводоросли, не накапливающей вторичных каротиноиды), что, возможно, указывает на специфические взаимодействия бактерий данного рода и каротиногенных микроводорослей.

В работе проведена оценка особенностей микробиома четырех штаммов каротиногенных микроводорослей. Показано сходство таксономического состава штаммов, полученных в 2020 году из разных регионов, а также сходство состава сопутствующих бактерий для длительного культивируемых штаммов, выделенных из одного региона. Высказано предположение о наличии специфических взаимодействий между бактериями рода *Devosia* (пор. *Rhizobiales*) и каротиногенными микроводорослями, ввиду присутствия данной бактерии в микробиоме только каротиногенных штаммов, исследованных в рамках данной работы.

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

ГЛИКОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДОВ *CURTOBACTERIUM*, *CLAVIBACTER* И *RATHAYIBACTER*

В.А. Зайчиков¹, Д. Ким¹, Н.В. Потехина^{1*}, Е.М. Тульская¹, Л.И. Евтушенко²

¹МГУ им. М. В. Ломоносова (МГУ), Биологический факультет,
кафедра микробиологии;
e-mail: potekhina56@mail.ru

²Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ),
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (ИБФМ),
ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино

Семейство *Microbacteriaceae* насчитывает более 50 родов и объединяет виды актинобактерий, многие из которых известны как фитопатогены. Большинство описанных видов охарактеризованы по составу сахаров клеточной стенки, однако гликополимеры (ГП) в настоящее время определены лишь у ограниченного числа штаммов. Исследования ГП важны как в фундаментальном, так и прикладном аспектах. Тип ГП для ряда грамположительных бактерий (включая актинобактерии) служит хемотаксономическим признаком рода или вида, а структуры и наличие специфических сахаров в их составе может способствовать пониманию функциональной роли ГП в процессах, связанных с колонизацией и инфекцией растений в природных сообществах.

Целью наших исследований является сравнительное изучение состава и особенностей структур ГП у представителей 6-ти видов *Curtobacterium*, 6-ти видов *Clavibacter* и 6-ти видов *Rathayibacter* семейства *Microbacteriaceae*, выделенных из различных растений и отличающихся по экологическим характеристикам (сапрофиты и фитопатогены).

Культуры микроорганизмов выращивали аэробно на пептонно-дрожжевой среде. Клеточную стенку получали методом дифференциального центрифугирования из разрушенных ультразвуком клеток. ГП экстрагировали из клеточных стенок трихлоруксусной кислотой и исследовали химическими и ЯМР-спектроскопическими методами.

У всех изученных представителей родов *Curtobacterium*, *Clavibacter* и *Rathayibacter* обнаружены бесфосфатные ГП и отмечены общие закономерности в их составе и распространении: у *Curtobacterium* – линейный незамещенный L-рамнан, у *Clavibacter* – пирувилированный галактоманнан и галактофурананы, у *Rathayibacter* – замещенные D-рамнаны, рамноманнаны и тейхуроновые кислоты. Для *Clavibacter* и *Rathayibacter* выявлены особенности состава и структур ГП, видоспецифичные для типовых штаммов рода и штаммов-претендентов на новый вид. ГП клеточных стенок большинства изученных штаммов содержат остатки пировиноградной кислоты.

Таким образом, у представителей семейства *Microbacteriaceae*, исследованных нами, а также описанных в литературе (род *Microbacterium*), в клеточной стенке идентифицированы ГП различных типов. Выявленные типы ГП специфичны для родов, а их набор и особенности структур согласуются с видовой принадлежностью штаммов. Полученные данные также представляют интерес в связи с вопросами экологии актинобактерий, выделенных из разных мест обитания, в том числе растений.

СТРУКТУРА И РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ КРИОКОНИТОВ*

Иванова Е. А.^{1**}, Гладков Г. М.², Кимеклис А.К.², Андронов Е. Е.², Абакумов Е. В.³

¹Почвенный институт им. В. В. Докучаева, Москва, info@esoil.ru;

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, arriam2008@yandex.ru;

³Санкт-Петербургский государственный университет, e.abakumov@spbu.ru
**ektrnivanova@gmail.com; +79052597172

Криокониты — специфические экосистемы с экстремально низкими температурами и малым количеством органического вещества, при этом являющиеся “горячими точками” для развития микроорганизмов на ледниках. На сегодняшний день информации о микробиоте этих объектов все еще недостаточно, и проведено мало исследований их микробных сообществ с использованием молекулярно-биологических методов.

Цель работы — анализ микробиомов криоконитов в широком географическом аспекте. Изучены образцы высокогорий — Северного Кавказа (г.Гара-Баши, Шхельда) и Урала (Иган), а также ледников Арктики (м.Баранова) и Антарктики (о-в Ливингстон).

Выделение ДНК проводили с использованием DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen), секвенирование библиотек гена 16 S рНК — на Illumina MiSeq, анализ таксономического состава — с использованием пакета DESeq2, реконструкцию потенциальных метаболических путей — утилитой Picrust2.

Для криоконитов высокогорного сообщества ледника г.Гара-Баши (3858м) и полярных широт зафиксировано низкое количество фило типов. Отмечена гетерогенность образцов о-ва Ливингстон, обусловленная, в том числе, орнитогенным воздействием. В криоконитах Сев. Кавказа индексы альфа-разнообразия обратно пропорциональны результатам оценки микробной биомассы, что можно объяснить большей «гомогенностью» (и, по-видимому, более узкой функциональной специализацией) более многочисленных высокогорных сообществ.

Значимые различия между исследуемыми группами образцов вносят представители *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*. Для метаболического профиля характерно преобладание ферментов аэробного метаболизма (цитохром с) и белков (синтеза аминокислот), что указывает на потенциально высокий уровень метаболической активности микробного сообщества. Это можно объяснить репаративными потребностями клеток микроорганизмов в данных экологических условиях (оксигенно-стресса и экстремально низких температур).

В целом, отмечена специфичность микробиомного состава в зависимости от места пробоотбора, определяющая экологическую специфику исследуемых местообитаний. Низкие запасы доступного углерода и обеспеченности поверхности ледников доступными формами минерального питания, по-видимому, объясняют низкие уровни активности каталитических путей и углеродного обмена в метаболических профилях прокариотных комплексов криоконитов.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-05-50107.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ ГОРНЫХ ПОРОД, СОДЕРЖИМОГО ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ, ПОЕДАЕМЫХ ГРУНТЫ НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПОВЕДНИКОВ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Лебедева Е. Г.¹, Паничев А.М.², Рысева Ю. Ю.².

¹ФБУН «Дальневосточный геологический институт ДВО РАН, Владивосток,
microbiol@mail.ru

²ФБУН «Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, Владивосток

Геофагия — это феномен инстинктивного заглатывания грунтовых частиц, широко распространенный среди диких животных. Для этого они посещают определенные участки с

характерными ландшафтными образованиями, обозначаемыми как «кудуры». По геологической природе такие биоминеральные образования кудуров, как правило, представлены глинистыми породами, в частности смектитами и цеолитами (Паничев 2012). Кудуры описывались для самых различных регионов мира, в Приморском крае кудуры находятся в Ольгинском, Тернейском и Пожарском районах. Наиболее типичные их посетители – травоядные млекопитающие, изюбрь (*Cervus elaphus*) и кабарга (*Moschus moschiferus*) (Паничев 2012; Plummer 2018). В литературе выдвигалось несколько предположений о значении микробиологического состава грунтов в явлении геофагии, однако этот вопрос остается до конца не раскрытым и мало исследованным во всем мире. В связи с этим целью исследования являлось изучить распространение, состав, численность физиологических групп и разнообразие микроорганизмов в горных породах и внутренних органах изюбря и кабарги, обитающих в заповедниках Приморского края.

Для проведения исследований в июле-сентябре 2020 г. были отобраны пробы горных пород и содержимого рубца и толстой кишки кабарги и изюбря, собранных в Тернейском и Ольгинском районах Приморского края. Отбор проб внутренностей животных производили с соблюдений строгой стерильности. Для выявления и культивирования бактерий использовали традиционные методы практической микробиологии. Анаэробные формы бактерий культивировали в анаэроостате с использованием газогенерирующих пакетов BD GasPak EZ. Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием молекулярно-генетических методов.

Результаты показали, что в горных породах присутствует довольно высокая численность бактерий, достигающая средних значений $4,4 \times 10^8$ КОЕ/гр. Среди физиологических групп особенно преобладали силикатные (до $1,2 \times 10^9$ КОЕ/гр), азотфиксирующие (до $9,2 \times 10^6$ КОЕ/гр), аммонифицирующие (до $8,4 \times 10^6$ КОЕ/гр) и осуществляющие гетеротрофную нитрификацию бактерии (до $2,2 \times 10^8$ КОЕ/гр). Данные группы микроорганизмов практически отсутствовали в содержимом рубца и кишки животных. Наибольшей численности в содержимом рубца и кишки животных достигали сапрофитные, амилолитические, сахаролитические, молочнокислые микроорганизмы и энтеробактерии. В горных породах наиболее широко встречались дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*, а также микроорганизмы рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Acidovorax* sp., *Flavobacterium* sp., *Variovorax* и другие. В содержимом рубца и толстой кишки животных отмечено значительное преобладание различных видов *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia*.

Таким образом, полученные результаты показали высокую численность и широкое разнообразие микроорганизмов в грунтах и содержимом внутренностей животных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-67-47005.

ОБИЛИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВ ЗАПОВЕДНИКОВ ВЬЕТНАМА

Лысак Л. В.¹, Князева А. Н.¹, Лапыгина Е. В.¹, Александрова А. В.²

¹Факультет почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова,

²Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

Важной экологической функцией почвы является сохранение и поддержание биологического разнообразия микробных сообществ. Известно, что высокое биологическое разнообразие организмов приурочено к тропическим лесам, большая часть которых сосредоточена в странах Центральной и Южной Америки и Юго-Восточной Азии, однако площадь их интенсивно сокращается под влиянием антропогенных воздействий. Изучение микробных сообществ почв под муссонными лесами на особо охраняемых природных территориях (ООПТ) Вьетнама является весьма актуальной задачей микробной экологии.

Нами были изучены микробные сообщества почв и сопряженных субстратов (подстилка, «подвешенная почва» в корзинках эпифитов) на территории ООПТ Вьетнама (Кат Тиен, Кон Ка Кинь, Кон Тю Ранг, Кон Плонг и Суан Шон).

Проведенные исследования микробных сообществ почв и растительного опада выявили высокие показатели численности бактерий, сравнимые или превышающие аналогичные

показатели для почв умеренного пояса. Длина актиномицетного мицелия достигала значительных величин, выше, чем в почвах умеренного пояса. При этом длина грибного мицелия была невысокой. Данные о количестве копий генов 16S рРНК прокариот и 18S рРНК микромицетов, полученные методом ПЦР в реальном времени в большинстве случаев коррелирует с результатами прямого люминесцентного метода, и отражают отмеченные выше закономерности. Численность фильтрующихся форм прокариот (ФФП) в исследованных образцах почв была выше, чем в почвах умеренного пояса, их содержание составляло от 5 до 15 %. Доля жизнеспособных клеток среди ФФП также была выше, чем среди клеток обычного размера (50–60 %), и составляла от 75 до 85 %.

Показатели обилия культивируемых сапротрофных бактерий, полученные классическим методом посева, в опаде были выше, чем в верхнем гумусированном горизонте. Специфической особенностью сапротрофного бактериального комплекса было доминирование в почве и опаде актиномицетов, в опаде к актиномицетам присоединялись протеобактерии, представленные, в основном, миксобактериями. Высокие показатели длины актиномицетного мицелия и доминирование актиномицетов в сапротрофном бактериальном комплексе свидетельствуют о значительной роли актиномицетов в деструкции растительных остатков, поступающих на поверхность почвы в исследованных биотопах. Изучение специфического для тропического фитоценоза локуса – «подвешенной почвы» в корзинках эпифитов свидетельствует о близости микробного сообщества «подвешенной почвы» к ризосфере и ризоплане.

Проведенный метагеномный анализ (баркодинг вариабельного региона гена 16S рРНК) бактериального сообщества аллювиальной бурой почвы, «подвешенной» почвы и растительного опада выявил доминирование филумов Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria, ниже содержание филумов Chloroflexi, Firmicutes и Verrucomicrobia, еще ниже Nitrospirae, Planctomycetes и Gemmatimonadetes. Наибольшие показатели разнообразия (на уровне ОТЕ) наблюдались в образцах «подвешенной почвы», ниже – в горизонте А и растительном опаде. Прокариотное сообщество «подвешенной почвы» по разнообразию таксонов (ОТЕ) проявляет значительное сходство с сообществом верхнего горизонта А, что подтверждается значениями меры сходства по метрикам Брея-Кертиса (0,41) и weighted UniFrac (0,39).

Высокие показатели длины актиномицетного мицелия, доминирование актиномицетов в сапротрофном прокариотном комплексе и высокое филогенетическое разнообразие свидетельствуют о значительной роли актиномицетов в деструкции растительных остатков, поступающих на поверхность почвы. Активное развитие актиномицетов в подстилке делает этот локус перспективным для выделения штаммов актиномицетов для целей биотехнологии.

РАЗНООБРАЗИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОГО МИКРОБИОМА В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ И АБИОГЕННОЙ НАГРУЗОК

Манучарова Н. А.

МГУ им. М. В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, soil.msu@mail.ru

Современная биотехнология рассматривает почву как главный природный банк при поиске культур микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами. Выяснение свойств почв, способствующих формированию и сохранению биоразнообразия, получение культур микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом (способность азотфиксации, гидролитической деятельности природных полимеров и ксенобиотиков, синтез вторичных метаболитов) – важнейшая научная проблема современной биологии и почвоведения. Для сохранения биоразнообразия огромное значение имеет протекторная функция почвы – консервация в жизнеспособном состоянии различных переживающих стадий организмов. Значительный интерес представляют собой микроорганизмы, выделенные из экстремальных местообитаний, поскольку именно они, по мнению ряда авторов, характеризуются более высокой биологической активностью по сравнению со штаммами, выделенными из почв умеренных широт. Новизна разработанного подхода состоит в возможности усиления биотехнологических свойств микроорганизмов путем интродукции высокоактивных селекционных

штаммов и создания условий для их деятельности в природных системах и агроценозах. Целью исследований было оценить разнообразие метаболически активного микробного комплекса, включающее прокариотную (бактерии и археи) составляющую; выявить способность систем к процессам, направленным на деструкцию труднодоступных соединений и определить наличие функциональных генов у микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом способных к метаболической активности в почвах, различающихся параметрами основных экологических факторов.

Проведено комплексное исследование разнообразия гидролитических прокариотных комплексов (бактерии и археи), формирующихся в зависимости от структуры биогеоценоза и экологических факторов (температуры, влажности, окислительно-восстановительного потенциала, органического вещества, времени). Молекулярно-биологическими методами (модифицированный анализ гибридизации клеток *in situ* FISH, RT-PCR, метагеномный анализ) определена численность и изучено разнообразие метаболически активных углеводородоокисляющих микроорганизмов. Экспериментально показано, что микробный комплекс реликтовых систем обладает более высоким биологическим потенциалом по сравнению с комплексом современных почв. Авторами обнаружена новая функция актинобактерий (мицелиальных форм) в развитии гидролитического комплекса. Дыхание комплекса в широком диапазоне значений (влажности, поступления органического вещества, сукцессионного времени) может существенно контролироваться актиномицетами, роль которых определяется не столько их непосредственной гидролитической активностью, сколько вкладом в контроль функционирования микробного комплекса, по-видимому, посредством характерной для актиномицетов продукции биологически активных веществ, в данном случае – с регуляторной функцией. Следует отметить, что комплекс бактерий, устойчивых к загрязнению углеводородами, может быть интересен также с точки зрения скрининга штаммов-продуцентов новых антибиотиков, действующих на резистентные формы патогенных микроорганизмов.

СИНХРОННАЯ ДИНАМИКА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ И МИКРОЭУКАРИОТ ФОТИЧЕСКОГО СЛОЯ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Михайлов И. С., Галачьянц Ю. П., Букин Ю. С., Петрова Д. П., Башенхаева М. В., Сакирко М. В., Титова Л. А., Захарова Ю. Р., Лихошвай Е. В.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, mikhailov-89@mail.ru

Бактерии и микроэукариоты выполняют ключевую роль в пищевой сети и биогеохимических циклах водных экосистем. В настоящее время с помощью высокопроизводительного секвенирования исследуются структура и разнообразие микробных сообществ различных экологических ниш, а также устанавливается влияние абиотических факторов среды на состав этих сообществ. Однако, для интегрального понимания взаимосвязи структуры и функционирования микробных сообществ необходимо исследовать состав сообществ, комплексные взаимосвязи между отдельными таксонами микроорганизмов, а также их функциональные особенности, с учетом изменений условий среды их обитания.

Целью работы было выявить синхронные паттерны и потенциальные функциональные особенности бактерий и микроэукариот в течение их сезонной сукцессии в фотическом слое озера Байкал. С помощью секвенирования ампликонов фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК на Illumina MiSeq и последующего анализа данных выявлена сезонная сукцессия отдельных операционных таксономических единиц (ОТЕ, 97 % сходства) бактерий и микроэукариот. С помощью кластеризации методом *k*-средних выявлено, что различные ОТЕ формируют синхронные кластеры, отличающиеся по сезонной динамике. В зависимости от времени доминирования эти кластеры подразделялись на несколько сезонных групп (весенняя, весенне-летняя, летняя, и осенняя). Среди синхронных бактериальных кластеров было несколько весенних, например, один состоял только из представителей Actinobacteria, другой из Flavobacteriia, Verrucomicrobia, Alphaproteobacteria, в летнем были ОТЕ Bacteroidetes и Betaproteobacteria, а в осеннем кластере преобладали Cyanobacteria. Доминирующими таксонами в синхронных кластерах микроэукариот были различные микроводоросли и простей-

шие. В подледный период преобладали Dinophyceae и Ciliophora, в период весенней гомотермии Diatom и Chrysophyceae, летом и осенью Chlorophyta, Chrysophyceae, Chryptomonadales. На основе знаний об экологической роли различных таксонов микроэукариот, они были подразделены на функциональные группы (автотрофы, гетеротрофы, миксотрофы), соотношение которых изменялось в разные сезоны. Синхронные кластеры ОТЕ микроэукариот в основном состояли из представителей разных функциональных групп, что может соответствовать сосуществованию пар продуценты и консументы/паразиты. Однако в некоторых кластерах преобладали ОТЕ, принадлежащие одной группе. С помощью PICRUSt2 выполнен анализ предсказанных функциональных генов бактериальных сообществ, на основе данных о структуре сообществ, и выявлены общие и специфичные гены для различных таксонов бактерий. В зависимости от сезона преобладали разные гены, и соответственно разные потенциальные метаболические пути. Например, летом преобладали пути расщепления полисахаридов, а осенью фиксации углерода и метаболизма азота.

Таким образом, выявленные паттерны синхронности показывают потенциальные экологические взаимосвязи между различными микроорганизмами и закономерности их организации в сообществах. Данные о предсказанной функциональности и подразделение микроорганизмов на функциональные группы способствуют пониманию роли отдельных таксонов микроорганизмов в сообществах и созданию новых гипотез, которые затем можно будет более точно проверить с помощью лабораторных экспериментов, анализа метаболитов, геномов и транскриптомов.

Работа выполнена при поддержке тем МИНОБРНАУКИ 0279-2021-0008 и 0279-2021-0009.

МИКРОБИОМ ПОЧВ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ АРХИПЕЛАГА НОВАЯ ЗЕМЛЯ

Никитин Д. А.

Почвенный институт им. В. В. Докучаева, Москва, e-mail: dimnik90@mail.ru

Введение. Изучение полярных регионов актуально ввиду стремительного потепления в них по сравнению с другими территориями. Микроорганизмы быстро реагируют на изменения окружающей среды, поэтому могут служить индикаторами смены климата. Потепление увеличивает активность микроорганизмов и эмиссию парниковых газов из почвы. Новая Земля (НЗ) — наибольший и самый неизученный архипелаг Европейской Арктики, информация о микроорганизмах которого фрагментарна. **Цель работы** — оценка интенсивности эмиссии CO_2 , CH_4 и N_2O , биомассы прокариот и грибов, численности рибосомальных генов и таксономической структуры микроорганизмов в почвах НЗ.

Материалы и методы. Исследованы карбопетроземы, пелоземы и криоземы НЗ районов Русской Гавани, Ледяной Гавани, Бухты Благополучия и мыса Желания. Эмиссию CO_2 , CH_4 и N_2O оценивали газохроматографическими методами; биомассу микроорганизмов — люминесцентной микроскопией; количество рибосомальных генов 16S и ITS рРНК — методом qPCR-real time; таксономическую структуру сообщества прокариот — методом пиросеквенирования NGS на платформе Illumina MiSeq.

Результаты и обсуждение. Базальное дыхание варьировало от 0,27 до 243,73 мкг $\text{C-CO}_2/(\text{г}\times\text{сут})$; субстрат-индуцированное дыхание — от 3,36 до 1476,07 мкг $\text{C-CO}_2/(\text{г}\times\text{сут})$; эмиссия метана — от 0,48 до 6,18 нг $\text{CH}_4/(\text{г}\times\text{сут})$; интенсивность денитрификации — от 0,50 до 18,81 мкг $\text{N-N}_2\text{O}/(\text{г}\times\text{сут})$.

Биомасса микроорганизмов изменялась от 22,50 до 390,18 мкг/г почвы. Доля грибов в ней составляла от 80 до 98 %. Численность прокариот колебалась от $1,5\times 10^7$ до $9,66\times 10^8$ клеток/г почвы, а биомасса грибов — от 22 до 372 мкг/г почвы. Длина мицелия актиномицетов мала — от 0,6 до 23,5 м/г почвы, а грибных гиф — до 166 м/г почвы).

Численность копий рибосомальных генов 16S рРНК архей мала — от $2,30\times 10^7$ до $1,63\times 10^9$, у 16S рРНК бактерий — варьирует от $3,47\times 10^8$ до $2,26\times 10^{11}$, а у ITS рРНК грибов — изменялась от $8,87\times 10^6$ до $7,56\times 10^9$ копий генов/г почвы.

Среди бактерий доминировали (обилие > 20 %) филумы Proteobacteria, Actinobacteria и Acidobacteria; гораздо меньше (1–10 % обилия) филумов Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes и Chloroflexi. На долю домена Archaea, представленного в основном родом *Ferroplasma* из филума Euryarchaeota, приходилось ≤ 10 % обилия.

Заключение. Таким образом, впервые охарактеризован почвенный микробиом севера НЗ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00328.

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ В ПСИХРОФИЛЬНЫХ ОСАДКАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗГРУЗКОЙ УГЛЕВОДОРОДОВ

Павлова О. Н.¹, Черницына С. М.¹, Ломакина А. В.¹, Тупикин А. Е.²,
Земская Т. И.¹, Кабилов М. Р.²

¹ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск,
pavlova@lin.irk.ru

²ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, kabilov@niboch.nsc.ru

Озеро Байкал, как холодноводный и олиготрофный водоем, характеризуется наличием метановых сипов, скоплений газовых гидратов, грязевыми вулканами и естественными нефтепроявлениями. Учитывая геологические особенности озера, была высказана гипотеза, о том, что в Байкале могут действовать схожие механизмы поступления термофильных прокариот из зоны генерации углеводородов в поверхностные осадки вместе с газонасыщенными флюидами, выявленными для холодноводных морских осадков. Анализ фрагментов гена 16S рРНК клональных библиотек термофильных накопительных культур из донных осадков нефтяного сипа «Б. Зеленовская» выявил представителей родов *Caloramator* sp., *Tepidanaerobacter* sp., *Caldanaerobius* sp., *Symbiobacterium* sp., *Fervidicola* sp., *Desulfotomaculum* sp. В накопительных культурах из донных осадков метанового сипа, грязевого вулкана и нефте-метанового сипа «Горевой Утес» обнаружены последовательности термофильных представителей рода *Caldinitratiruptor* sp., *Planifilum* sp., *Symbiobacterium* sp. и *Thermaerobacter* sp. с доминированием последовательностей рода *Thermaerobacter* sp. Получена чистая культура *Thermaerobacter* sp. PB12/4term для которой установлена способность к миксотрофному типу питания, не характерному для пяти видов этого рода, являющихся строгими аэробами. В автотрофных условиях штамм PB12/4term способен получать энергию путем окисления водорода с использованием элементарной серы, тиосульфата, нитрата и нитрита в качестве акцептора электронов и CO₂/HCO₃⁻ в качестве источника углерода. Общий размер генома нового изолята составил 2.820.915 п. н. с содержанием GC 72,2 %. Филогенетический анализ, проведенный с использованием полных геномов с помощью GTDB-tk, подтвердил, что штамм PB12/4term наиболее тесно связан с представителями рода *Thermaerobacter*. Ближайшими соседями PB12/4term являются *Thermaerobacter subterraneus* (ANI = 95,08 %, AF = 0,91) и *Thermaerobacter marianensis* (ANI = 84,98 %, AF = 0,77). Сравнение геномов PB12/4term и *T. subterraneus* выявило у последнего делецию размером 388 Кб, которая содержала 341 ген, кодирующий различные классы ферментов. В свою очередь в геноме PB12/4term отсутствуют 242 гена, присутствующие в *T. subterraneus*. Полученные данные позволяют предположить, что вначале произошло разделение предков *Thermaerobacter marianensis* и PB12/4term, а далее в результате делеции большого района генома произошло разделение PB12/4term и *T. subterraneus*. Филогеномный анализ позволил уточнить таксономическое положение рода *Thermaerobacter*, который, как оказалось, относится не к кластридиям, а к отдельному типу Firmicutes E, который включает 6 классов.

Проведенные исследования показали, что микробное сообщество накопительных культур, полученных из низкотемпературных осадков при температуре культивирования 60 °С в основном представлено бактериями из термальных источников, осадков грязевых вулканов и

загрязненных углеводородами сред с 97–99 % гомологии по гену 16S рРНК, географически весьма отдаленных от оз. Байкал. Их появление в осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, может быть обусловлено деятельностью в том числе гидротерм, расположенных на глубине 5–6 км, формирование которых проходило в начале неогенового периода.

Исследования выполнены в рамках гос. задания по теме № 0279-2021-0006.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ СОЛЕННЫХ ОЗЕР НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Пельтек С. Е.^{1,2}, Брянская А. В.^{1,2}, Шипова А. А.^{1,2}, Уварова Ю. Е.^{1,2}, Розанов А. С.^{1,2},
Старостин К. В.^{1,2}, Горячковская Т. Н.^{1,2}, Таран О. П.³, Лазарева Е. В.⁴,*

¹Лаборатория молекулярных биотехнологий, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, **bal412003@mail.ru*

²Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

³Институт катализа им. Г. К. Борескова, Новосибирск

⁴Институт геологии и минералогии им. В. С. Соболева, Новосибирск

Новосибирская область — равнинный край. На ее территории располагается около 3000 озер, большая часть из которых — маленькие безымянные водоемы. Находясь на незначительном расстоянии друг от друга, эти водоемы имеют собственную территорию водосбора и, не смотря на достаточно схожие условия образования, сильно отличаются по геохимическим показателям. Они в большинстве случаев бессточные и имеют небольшую глубину, многие — в разной степени засолены (от слабосоленых до самосадочных). Помимо концентрации соли воды озер отличаются по составу ионов и рН (от 6,5 до 11) (Сорокин, 2007).

Для некоторых достаточно крупных озер, например: Большое и Малое Яровое, Кротовая Ляга и ряд других проведены геохимические и гидробиологические исследования (Опыт комплексного изучения..., 1982; Лебедева и др., 2008). В то время как о химическом и микробиологическом составе воды и донных осадков небольших озер Новосибирской области до недавнего времени данных не было совсем.

Изучение микробных сообществ небольших соленых озер Новосибирской области коллективом авторов было начато в 2008 г. и продолжается до сих пор. Для повышения эффективности исследований и последующей корректной интерпретации данных была проведена работа в составе междисциплинарной команды, что позволило уже на первых этапах получить подробнейшую геохимическую информацию о составе поверхностных растворов и донных отложений, содержании и накоплении различных элементов, некоторых вопросах минералообразования и др. (Лазарева и др., 2012).

В результате многолетних микробиологических исследований было впервые проведено описание микробных сообществ воды, матов и донных отложений небольших соленых озер Новосибирской области (Bryanskaya et al., 2016). Проведено описание и сравнительный анализ микробного состава различных слоев колонки донных отложений на примере озера Солёное (модельный объект) в соответствии с данными подробного геохимического анализа. Выделено более 500 штаммов микроорганизмов различных групп, для 260 из которых проведено полногеномное секвенирование. Осуществлена филогенетическая, фенотипическая и масс-спектрометрическая характеристика штаммов. На основании данных метагеномного секвенирования была проведена сборка метагеномов (сообществ озер), из которых были экстрагированы геномы (MAG) некоторых микроорганизмов. Обнаружены новые виды в доменах архей и бактерий.

Более подробный отбор проб во времени и пространстве может дать нам в будущем более детальное понимание влияния градиентов окружающей среды на конкретные микробные популяции и функциональные группы. На следующем этапе исследований мы планируем применить транскриптомный и протеомный подходы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по проектам № 0259-2021-0010 (Лаборатория молекулярных биотехно-

логий, ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН) и № 075-15-2019-1662 (Курчатовский геномный центр, ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН). Работа выполнена в Центре коллективного пользования «Коллекция микроорганизмов биотехнологического назначения в целях поиска новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии и биоинженерии» ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА И МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЦИКЛА МЕТАНА В ВЫСОКОШИРОТНЫХ ТУНДРОВЫХ ОЗЕРАХ ПОЛУОСТРОВА ЯМАЛ

Саввичев А.С., Русанов И. И., Кадников В. В.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
Институт Биоинженерии им. К. Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

В июле 2019 года проведены микробиологические, молекулярно-экологические, биогеохимические и изотопно-геохимические исследования в четырех озерах центральной части полуострова Ямал в зоне сплошной вечной мерзлоты. Два озера были относительно большие и глубокие (до 10,6 и 12,3 м) и были встроены в геоморфологический рельеф ландшафта полуострова, а два других были меньше по площади и глубине (2,3 и 1,8 м) и имели классический термокарстовый генезис. В период проведения исследований во всех озерах обнаружена высокая продукция фитопланктона ($340-1200 \text{ мг С м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$) характерная для короткого летнего сезона Ямала. Аллохтонное и автохтонное органическое вещество подвергалось частичной микробной деструкции в водной толще озер, однако большая часть ОВ попадала в донные отложения. Показано, что из-за крайне низкого содержания сульфат-иона процесс микробной сульфатредукции был практически не выражен, поэтому терминальным продуктом разложения ОВ был метан. Содержание растворенного метана в поверхностном слое осадков составляло $33-990 \text{ мкмоль СН}_4 \text{ дм}^{-3}$. Интенсивность процесса гидрогенотрофного метаногенеза, измеренная *in situ* радиоизотопным методом, была низкая и мало различалась в осадках всех четырех исследуемых водоемов.

В составе анаэробной компоненты микробных сообществ донных отложений всех озер доминировали метаногенные археи родов *Methanoregula* и *Methanosaeta*. В поверхностных окисленных слоях донных отложений был выявлен процесс микробного окисления метана ($1,4-9,9 \text{ мкмоль дм}^{-3} \text{ сут}^{-1}$). В составе метанотрофного микробного сообщества поверхностного слоя донных отложений, а также водной толщи выявлены бактерии *Methylobacter tundripaludum* (семейство *Methylococcaceae*).

Активность метанотрофных бактерий в водной толще исследуемых водоемов составляла от $3,6$ до $55 \text{ нмоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$. Потребление метана приводило к уменьшению концентрации этого газа от придонного к поверхностному водному горизонту, причем в глубоких водоемах суммарный метанотрофный биогеохимический эффект был более выраженным, чем в мелких термокарстовых озерах, где концентрация метана в поверхностной воде составляла $310-480 \text{ нмоль л}^{-1}$. Изотопный состав углерода растворенного метана (ИСУ СН_4) в составе донных отложений $\delta^{13}\text{C СН}_4$ варьировал от $-80,8 \%$ до $-63,3 \%$. Значительное варьирование ИСУ СН_4 является следствием различной активности метанотрофного микробного сообщества. Показано, что ИСУ СН_4 коррелирует с интенсивностью процесса окисления метана.

В результате проведенных исследований было показано, что мелкие термокарстовые озера Ямала в короткий летний сезон являются источником метан - важного парникового газа, выделяющегося в приводный слой атмосферы. Напротив в глубоких озерах сообщество метанотрофных бактерий служит естественным природным фильтром, утилизирующих значительное количество метана непосредственно в водной толще. Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 20-04-00487, а также министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ФИКСАЦИЯ АЗОТА ФОТОТРОФНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ СОДОВЫХ ОЗЁР КУЛУНДИНСКОЙ СТЕПИ (АЛТАЙСКИЙ КРАЙ, РОССИЯ)

Самылина О. С.^{1*}, Намсараев З. Б.², Турова Т. П.¹, Сорокин Д. Ю.¹

¹ Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

² Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский институт», Москва

*olga.samyлина@gmail.com

Мелководные содовые озера Кулундинской степи представляют собой уникальный пример полиэкстремальных местообитаний. Для них характерен переменный гидрологический режим с высокоамплитудными циклическими колебаниями физико-химических параметров при стабильно щелочных значениях pH. Доступность азота является одним из важнейших факторов, лимитирующих продуктивность экосистем, но diaзотрофный сегмент цикла азота в содовых условиях остается малоизученным, и в особенности, его аэробная часть. В связи с этим, целью наших многолетних исследований было изучение *in situ* закономерностей фиксации азота фототрофными сообществами содовых озёр Кулундинской степи.

Методом ацетиленредукции было установлено, что фототрофные сообщества исследуемых озёр фиксируют молекулярный азот в широком диапазоне солёности (25–400 г/л), при этом солёность является основным фактором, влияющим на разнообразие и активность diaзотрофов в этих сообществах. С использованием микроскопических и молекулярно-биологических методов установлено, что фототрофные diaзотрофы были представлены цианобактериями, пурпурными серными бактериями *Ectothiorhodospira* sp. и нитчатými аноксигенными фототрофными бактериями «*Cand. Viridilinea mediisalina*». Среди diaзотрофных цианобактерий в различных условиях доминируют гетероцистные (*Nodularia* spp., *Anabaenopsis* spp.), нитчатые негетероцистные (*Sodalinema* sp., *Nodosilinea* sp.) и одноклеточные (*Eubalothese* sp.). Сообщества с *Nodularia* spp. развивались при солёности до 60 г/л и фиксировали азот как днём, так и ночью. Сообщества с негетероцистными цианобактериями фиксировали азот в светлое время суток при солёностях 55–100 г/л, но при 100 г/л скорость процесса существенно снижалась. При солёности 160–210 г/л фототрофные сообщества хоть и встречались, но находились в угнетённом состоянии, и фиксацию азота осуществляли преимущественно гетеротрофные микроорганизмы в тёмное время суток. При максимальных засолениях (выше 350 г/л) между кристаллами выпадающей в осадок троны развивались сообщества с доминированием одноклеточных экстремофильных цианобактерий *Eubalothese* sp., и фиксация азота проявлялась вновь в светлое время суток, однако скорость процесса была невысокой.

Светозависимый характер фиксации азота и выявленное разнообразие *nifH*-генов в широком диапазоне солёности указывают на важную роль цианобактерий в этом процессе. Вклад *Ectothiorhodospira* sp. остаётся неясным, несмотря на распространение этих бактерий во всем исследованном диапазоне солёности. Массовое развитие «*Cand. Viridilinea mediisalina*» было отмечено при радикальном распреснении исследованных озёр до 13–30 г/л, однако их вклад в фиксацию азота пока не исследован.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-04-00377 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОЧВЕННОГО МИКРОБИОМА: НАСКОЛЬКО ОНИ ОТРАЖАЮТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ?

Семенов М. В.¹, Поздняков Л. А.², Ксенофонтова Н. А.¹

¹ ФГБНУ ФИЦ «Почвенный институт им. В. В. Докучаева», Москва

² МГУ им. М. В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва
mikhail.v.semenov@gmail.com

Введение. В настоящее время доминирующим подходом к оценке микробного сообщества почвы является анализ тотальной почвенной ДНК, позволяющий оценивать таксономический состав и функционально-генетический потенциал почвенного микробиома. Тем не менее, до сих пор остается открытым вопрос о применимости генетических показателей при оценке и прогнозировании реальной или потенциальной микробиологической активности почвы. В данном исследовании была произведена попытка выявить связи между генетическими показателями почвенного микробиома и активностью ряда микробиологических процессов.

Материалы и методы. Исследовали микробное сообщество серой почвы (Phaeozem) пяти экосистем (лес, луг; пашня без удобрений, с NPK и с внесением навоза). Для учета временной изменчивости образцы почв отбирали пять раз в течение года – с апреля по октябрь. Экстрагировали ДНК и РНК, определяли численность рибосомальных генов и транскриптов бактерий, архей и грибов, а также функциональных генов, ассоциированных с процессами цикла азота (*nifH*, *amoA*, *nirK*, *nirS*). Проводили 16S-метабаркодинг тотальных (ДНК) и активных (РНК) сообществ прокариот с прогнозированием их функционального профиля. Определяли микробную биомассу, активность микробиологических процессов (гетеротрофное дыхание, азотфиксацию и денитрификацию), и физиологический профиль микробиома методом CLPP.

Результаты и обсуждение. Микробная биомасса и активность дыхания коррелировали с численностью копий генов бактерий и архей. Количество генов и транскриптов генов *nifH*, *nirS* и *nirK* положительно коррелировала с микробной биомассой и численностью копий генов 16S бактерий, но не была связана с потенциальной или актуальной активностью ассоциированных с ними процессов. Численность *nifH*, *nirS* и *nirK* также не коррелировала с долей этих генов в метагеномном профиле. В то же время, количество генов *nifH* положительно коррелировало с долей *Verrucomicrobia*, *Acidimicrobia* и *Nitrososphaeria*, *nirK* и *nirS* – с *Acidimicrobia*. Потенциальная азотфиксация положительно коррелировала с долей *Armatimonadetes* и *Chloroflexi*, актуальная денитрификация – с *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Thaumarchaeota*. Физиологический профиль сообщества был наиболее тесно связан как с микробной биомассой и гетеротрофным дыханием, так и с общей таксономической структурой сообществ и численностью отдельных таксонов, особенно *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes* и *Verrucomicrobia*.

Заключение. Численность рассматриваемых функциональных генов являлась функцией общей микробной биомассы и не отражала ни реальную, ни потенциальную активность процесса, что указывает на их низкую индикаторную применимость для задач прогнозирования активности микробиологических процессов в почве. В то же время, выявлены тесные корреляции активности дыхания и физиологического профиля с численностью отдельных таксонов и со структурой прокариотных сообществ в целом.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-04-00315.

МИКРОБНЫЕ ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Сидорова Д. Е.¹, Падий Д. А.^{1,2}, Чурсина М. А.^{1,2}, Плюта В. А.¹, Хмель И. А.¹

¹ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», Москва

²ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

Многие виды бактерий синтезируют большое разнообразие летучих органических соединений (ЛОС). Эти вещества могут влиять на активность ферментов, на экспрессию генов других организмов, выполнять роль химических сигналов и действовать на Quorum Sensing (QS) систему регуляцию бактерий.

Целью нашей работы является изучение бактериальных ЛОС с разной химической структурой (спиртов, кетонов, терпенов) и их действия на различные биологические объекты (бактерии и их биопленки, растения, животные).

Исследуемые ЛОС оказывают ингибирующее действие на фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* C58 и Chry5, а также способны подавлять образование биопленок агробактерий и убивать клетки в зрелых биоплёнках.

При количествах ЛОС, не оказывающих значительного бактерицидного действия на рост клеток специфических *lux*-биосенсорных штаммов *E. coli*, нами была исследована способность ЛОС модулировать бактериальную коммуникацию посредством влияния на QS системы RhlI/RhlR, LasI/LasR и LuxI/LuxR типов. Обнаружено, что некоторые ЛОС могут как подавлять QS системы всех трех типов, так и демонстрировать специфичное влияние на один из типов исследуемых QS систем.

При исследовании влияния ЛОС на модельное растение *Arabidopsis thaliana* установлено, что это растение было чувствительно к их действию: ЛОС не только ингибировали жизнедеятельность зрелых растений, но и подавляли прорастание семян. Действие некоторых ЛОС при определенных их количествах приводило к увеличению общей биомассы растения. Изучено действие летучих веществ на плодовых мушек *Drosophila melanogaster*. Было показано, что насекомые погибали быстрее всего при действии терпенов, хотя эти вещества не проявляли такого явного действия на другие исследуемые биологические объекты. Другие ЛОС также сильно ингибировали жизнедеятельность мушек, причем было отмечено, что с удлинением углеводородной цепи кетонов усиливалось подавление жизнедеятельности мух.

Работа частично финансировалась Фондом в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ на 2020-2021 годы (№ 121030200227-6).

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ПРОКАРИОТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ЦИКЛЕ СЕРЫ В МОРСКИХ ГИДРОТЕРМАХ

Слободкина Г. Б.^{1*}, Allioix M.², Меркель А. Ю.¹, Фролова А. А.¹, Alain K.², Jebbar M.²,
Слободкин А. И.¹

¹Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, info@fbras.ru

²Univ Brest, CNRS, Ifremer, F-29280 Plouzan, France

Цикл серы с участием сероокисляющих, сульфатредуцирующих и серодиспропорционирующих микроорганизмов имеет большое экологическое и биогеохимическое значение в морских гидротермальных системах. Разнообразие и метаболизм прокариот, диспропорционирующих соединения серы, изучены в гораздо меньшей степени по сравнению с другими микробными группами. В докладе представлены физиологические и геномные характеристики трёх термофильных серодиспропорционирующих бактерий. *Dissulfurirhabdus thermomarina* и *Thermosulfurimonas marina* были выделены нами из мелководной гидротермы острова Кунашир, *Thermosulfuriphilus ammonigenes* – из глубоководной гидротермы бассейна Лау, Тихий океан. Все бактерии относятся к филуму *Desulfobacterota*. Данные о встречаемости последовательностей гена 16S рРНК *Dissulfurirhabdus* в библиотеках генов показывают широкое распространение представителей этого рода. Анализ геномов выявил наличие у всех этих микроорганизмов полного набора генов, необходимых для фиксации CO₂ через восстановительный ацетил-КоА путь, и генов, необходимых для диссимиляционного восстановления сульфата, которые, вероятно, участвуют в диспропорционировании соединений серы.

При температурах выше 80 °С в глубоководных экосистемах экспериментально доказанной способностью к диссимиляционному восстановлению сульфата обладают только гипертермофильные археи рода *Archaeoglobus*, которые являются предметом многих фундаментальных и биотехнологических исследований. Несмотря на их значимость, в настоящее время род *Archaeoglobus* представлен всего пятью охарактеризованными видами. Из глубоководной гидротермы Срединно-Атлантического хребта нами выделен и описан новый вид, *A. neptunius*. Новый изолят является факультативным литоавтотрофом и растет за счет восстановления сульфата, сульфита или тиосульфата с использованием водорода или ряда органических соединений в качестве донора электронов. Геном содержит полный набор генов, участвующих в фиксации CO₂ (восстановительный ацетил-КоА путь), глюконеогенезе,

окислении водорода и жирных кислот и восстановлении сульфата. Сравнительный филогенетический анализ родственных видов, подкрепленный значениями ANI, AAI и AF, дает убедительные основания для реклассификации рода *Archaeoglobus*.

Полученные данные расширяют наши знания о разнообразии и энергетическом метаболизме прокариот, участвующих в круговоротах серы и углерода в морских гидротермальных системах.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПРИДОННОЙ ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

Строева А. Р.¹, Клюкина А. А.², Ахманов Г. Г.¹, Меркель А. Ю.²

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

² ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
a.r.stroeva@yandex.ru

Шельф Баренцева моря по богатству своих ресурсов, природным условиям и географическому положению является наиболее перспективным во всем Арктическом регионе. Целью настоящей работы является изучение разнообразия микроорганизмов (МО) в придонной воде (ПВ) и донных отложениях Баренцева моря, обитающих в низкотемпературных биотопах и использующих углеводороды (УВ) в качестве субстрата. Некоторые из них используют УВ как единственный источник углерода и энергии и, следовательно, могут являться индикаторами нефтепроявлений. В ходе экспедиции ТТР-19 на научно-исследовательском судне «Академик Николай Страхов», организованной Министерством высшего образования и науки РФ и МГУ им. М. В. Ломоносова, было отобрано 229 проб воды и грунта, включающих в себя образцы наилка, образцы донных осадков с интервалов 5 и 25 см от дна, а также образцы ПВ.

Все пробы были детально описаны и проанализированы с геологической, геохимической и гидрохимической точки зрения. Тотальную ДНК микробных сообществ из проб выделяли на судне сразу после отбора образцов. Затем в лаборатории был проведен анализ состава микробных сообществ методами NGS профилирования по гену 16S рРНК.

На основе проведенного анализа были выявлены наиболее распространенные группы МО в разных типах образцов. Для образцов фильтров ПВ: некультивируемые бактерии (НБ) семейства *Thioglobaceae* (SUP05 cluster), археи кандидатного рода *Nitrosopumilus*, протеобактерии рода *Woeseia* и НБ глубокого филогенетического кластера NB1-j. Для образцов предфильтров ПВ: НБ семейства *Nitrincolaceae*, протеобактерии рода *Pseudoalteromonas*, представители рода *Polaribacter* и археи кандидатного рода *Nitrosopumilus*. Для образцов наилка: НБ глубокого филогенетического кластера NB1-j, протеобактерии рода *Woeseia*, НБ семейства *Desulfobulbaceae* и некультивируемые *Gammaproteobacteria*. Для образцов с 5 см: некультивируемые планктомицеты класса *Phycisphaerae* (гр. MSBL9), НБ семейства *Desulfosarcinaceae* (гр. SEEP-SRB1), НБ глубокого филогенетического кластера NB1-j и НБ семейства *Desulfobulbaceae*. Для образцов с 25 см: НБ семейства *Anaerolineaceae*, некультивируемые планктомицеты класса *Phycisphaerae* (гр. MSBL9), НБ порядка *Aminicenantales* и НБ глубокого филогенетического кластера JS1 (*Caldatibacteriota*). Полученные филогенетические профили микробных сообществ были интерпретированы с эколого-функциональной точки зрения. В результате были получены профили распределения МО разных функциональных групп, например, аэробная хемогетеротрофия, которая наибольшую долю занимает в сообществах ПВ, тогда как брожение увеличивается с глубиной под поверхностью дна, сульфат- и сероредукция, проявляющиеся под поверхностью дна, аэробное окисление сульфида – в ПВ и т.д.

Впервые для ПВ и донных отложений Баренцева моря был получен столь обширный объем данных о составе микробных сообществ. Такой объем данных позволит выявить достоверные закономерности распространения отдельных групп МО с физико-химическими и геологическими характеристиками этой среды, в особенности, с присутствием тех или иных УВ. Эти данные будут способствовать разработке экспресс-методов разведки нефтяных проявлений в морях Арктического региона, а также методов оценки способности морских психроактивных сообществ к биоремедиации морских местообитаний.

ИЗУЧЕНИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ КАК ПУТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНОЙ ТЕМНОЙ МАТЕРИИ

Узун М. М.^{1,2*}, Козяева В. В.¹, Груздев Д. С.³

¹Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
uzunmasha@gmail.com

²ФГБОУВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»

³SciBear LLC, Таллин, Эстония

Несмотря на широкое использование подходов, не основанных на культивировании бактерий, большая часть «микробной темной материи» остается малоизученной. Магнитотактические бактерии (МТБ) могут помочь в решении этого вопроса благодаря возможности их сепарировать в отдельную фракцию методом магнитного обогащения. Такой способ облегчает изучение малопредставленных в экосистемах групп бактерий. Выявление новых МТБ может помочь получить данные о морфологии, метаболизме, экологии и эволюции бактерий из малоисследованных таксономических групп. Сепарация возможна благодаря способности МТБ синтезировать магнетосомы – кристаллы магнетита или грейгита, покрытые липопротеиновой мембраной. Синтез магнетосом контролируется генетически магнетосомным геномным кластером (МГК). Используя метод сепарации, за последний год было получено несколько новых геномов МТБ, принадлежащих различным слабоизученным филумам (*Fibrobacterota*, *Riflobacteria* и т. д.). Эти геномы были получены из почвенных местообитаний, наличие МТБ в которых ранее практически не изучалось.

В данной работе были отобраны образцы торфяно-болотной почвы. Используя подход к сепарации МТБ, названный «МТБ-CoSe», была получена фракция бактерий, чувствительных к магниту. Часть из них была сохранена для дальнейших морфологических исследований, а другая часть использовалась для выделения ДНК. Для оценки состава микробного сообщества последовательности генов 16S рРНК из полученной ДНК были секвенированы. В результате было выявлено доминирование МТБ филумов и классов *Desulfobacterota*, *Omnitrophota* и *Firestonebacteria*. Кроме того, с помощью технологий секвенирования Nanopore и Illumina были реконструированы геномы с высоким качеством сборки, содержащие гены синтеза магнетосом, и было определено их филогенетическое положение. Таким образом, впервые геномы МТБ были обнаружены у филумов *Firestonebacteria* и *KSB1*. Для генома *Firestonebacteria* была получена первая кольцевая сборка данного филума, и были исследованы основные метаболические пути, характерные для данной группы бактерий. Кроме того, МГК были обнаружены в геномах, принадлежащих филумам *Omnitrophota*, *Elusimicrobiota*, *Hydrogenedentota*, *Planctomycetota* и *Desulfobacterota*. Анализ генов МГК позволил обнаружить новые гены, связанные с синтезом магнетосом, специфичные для определенных групп МТБ. Были исследованы пути эволюции МГК и оценен вклад в них горизонтального переноса генов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90116.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СИСТЕМАТИКЕ МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ: МИНИМАЛЬНЫЕ СТАНДАРТЫ ДЛЯ ОПИСАНИЯ НОВЫХ ТАКСОНОВ 2.0.

Щербакова В. А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина,
ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино,
vshakola@gmail.com

Метаногенные археи, ранее известные как метаногенные бактерии или метаногены, представляют собой разнообразную полифилетическую группу строго анаэробных прокари-

от, способных производить метан в качестве основного продукта метаболизма. Эти микроорганизмы играют большую роль в биогеохимических циклах биогенных элементов и имеют большой биотехнологический потенциал.

Прошло более трех десятилетий с тех пор, как были предложены минимальные стандарты их таксономического описания. В свете достижений в области технологий научных исследований, новых поправок в систематической микробиологии и введения системы трех доменов важное значение имеет пересмотр старых критериев таксономического описания. Для этой цели в 2020 году был создан Подкомитет по метаногенным археям Международного комитета по систематике прокариот. По предложению Подкомитета сохраняется большинство рекомендованных ранее минимальных стандартов фенотипической характеристики чистых культур. Электронная микроскопия и хемотаксономические методы, такие как анализ профилей белков целых клеток и липидов, желательны, но не обязательны. Достижения технологий секвенирования ДНК позволяют получать полную или частичную последовательности генома для типовых штаммов и размещать ее в общедоступной базе данных, что теперь является обязательным. Геномные данные следует использовать для тщательного сравнения с близкими родственниками с использованием общих показателей, связанных с геномом, таких как средняя идентичность нуклеотидов и гибридизация ДНК-ДНК *in silico*. Также необходим филогенетический анализ гена 16S рРНК, который может быть дополнен анализом гена *mcrA* и филогеномным анализом с использованием множества консервативных однокопийных маркерных генов. Кроме того, теперь установлено, что чистота культуры не является существенной для изучения прокариот, и описание метаногенных таксонов в статусе *Candidatus* с использованием геномики и других подходящих критериев является жизнеспособной альтернативой.

Изменения минимальных критериев, предложенные членами Подкомитета, представляют строгое, но практическое руководство для таксономического описания метаногенных архей.

СЕКЦИЯ: МЕТАБОЛИЗМ И ГЕНОМИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КЛЕТКАХ СТРОГО АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Брюханов А. Л.

МГУ им. М. В. Ломоносова», биологический факультет, Москва, brjuchanov@mail.ru

Известно, что продукты неполного восстановления кислорода (пероксид водорода, супероксид-анион радикал, гидроксил-радикал) весьма токсичны и приводят к повреждению клеточных макромолекул. Поэтому для детоксикации активных форм кислорода (АФК) аэробные и факультативно анаэробные организмы содержат ферменты антиоксидантной защиты, важнейшими из которых являются каталаза, различные пероксидазы и супероксиддисмутаза (СОД). На ранних этапах изучения устойчивости клеток микроорганизмов к различным окислительным стрессам считалось, что гибель строгих анаэробов в присутствии кислорода связана именно с отсутствием в их клетках антиоксидантных ферментов. Однако впоследствии каталазная активность была найдена у различных анаэробных микроорганизмов, в частности, у представителей рода *Bacteroides*; а СОД была обнаружена в клетках ряда клостридий, сульфатредуцирующих бактерий (представители рода *Desulfovibrio*) и метаногенных архей (некоторые представители порядков *Methanobacteriales* и *Methanomicrobiales*).

При периодическом наступлении неблагоприятных аэробных условий в среде обитания (например, в циано-бактериальных матах, прибрежных донных осадках, периодически осушаемых рисовых полях, биоплёнках, кишечнике беспозвоночных и т. д.) синтез ключевых ферментов антиоксидантной защиты индуцируется и тем самым защищает клетки анаэробов от летального воздействия активных форм кислорода. К настоящему времени уже доказано, что некоторые метаногенные археи, клостридии и сульфатредуцирующие бактерии, обладающие популяционными (образование скоплений клеток, формирование сообществ с аэробными микроорганизмами, отрицательный азротаксис) и защитными ферментативными механизмами противодействия окислительным стрессам, способны сохранять жизнеспособность при относительно длительном кислородном воздействии и быстро возобновляют рост после восстановления анаэробных условий.

Некоторые метаногенные археи и, в особенности, сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) обладают в дополнение к СОД, каталазе и классическим пероксидазам чрезвычайно эффективными альтернативными ферментами антиоксидантной защиты, которые не образуют кислород в ходе катализируемых ими реакций и представляют собой уникальные негемовые Fe-содержащие белки — десульфоферродоксин и нееларедоксин (осуществляют детоксикацию супероксид-анион радикала по супероксидредуктазному типу), а также рубреритрин и нигеритрин (обладают НАДН-зависимой пероксидазной активностью). Кроме того, клетки некоторых СРБ, обладая электрон-транспортной цепью, даже способны к поглощению и восстановлению кислорода в качестве механизма защиты от окислительных стрессов.

Нами были очищены до гомогенного состояния и подробно охарактеризованы уникальные по своим молекулярно-биохимическим свойствам Fe-содержащие СОД, а также монофункциональные гемовые каталазы из метаногенных архей *Methanosarcina barkeri* и *Methanobrevibacter arboriphilus* — экстремальных анаэробов, способных, тем не менее, сохранять жизнеспособность в условиях кратковременного аэробнозиса. Проведён полный филогенетический анализ клонированных и секвенированных генов *sod* и *kat* метаногенных архей, причём обнаружение гена *sod* у представителя рода *Methanosarcina* представляет собой весьма интересный факт, поскольку данный ген не был найден ни у одного из филогенетически наиболее близких к *Methanosarcinaceae* микроорганизмов. Продемонстрирован значительный положительный эффект экзогенного гемина на каталазную активность у *Methanobrevibacter arboriphilus* и, соответственно, на существенное возрастание устойчиво-

сти данной метаногенной археи к различным окислительным стрессам. Доказано предположение, что *M. arboriphilus*, не содержащий цитохромов и утративший способность к синтезу гема, способен к синтезу апофермента гемовой каталазы.

На клетках архей и клостридий нами впервые были проведены комплексные исследования регуляции основных ферментов антиоксидантной защиты на транскрипционном и трансляционном уровнях в условиях окислительных стрессов различного характера и продолжительности. На *Methanosarcina barkeri* и *Clostridium acetobutylicum* показано значительное изменение экспрессии соответствующих генов *sod* и *kat* в зависимости от характера, дозы и продолжительности окислительных стрессов, а также от стадии роста культур.

Что касается СРБ, то нами была изучена выживаемость штаммов дикого типа *Desulfovibrio vulgaris* (одного из наиболее аэротолерантных строгих анаэробов) и полученных делеционных мутантов по генам, кодирующим супероксиддисмутазу (СОД) и супероксидредуктазу (СОР), в условиях различных окислительных стрессов. Таким образом, была показана важнейшая роль этих ферментов в защите клеток СРБ от активных форм кислорода. Впервые получены данные по регуляции компонентов PerR регулона, нигеритрина, тиол-пероксидазы, СОР и Fe-содержащей СОД в клетках *D. vulgaris* при кислородных, пероксидных и супероксидных стрессах. Также были проведены комплексные исследования механизмов антиоксидантной защиты, включая обнаруженную электрон-транспортную цепь восстановления кислорода, у выделенного нами из кислородсодержащих подповерхностных вод Чёрного моря в чистую культуру нового вида СРБ — *Desulfofrigus euxinos*.

Нами найдены СОД, каталазная и пероксидазная активности в клетках ряда пурпурных серных, пурпурных несерных и зеленых серных анаэробных фототрофных бактерий при различных условиях культивирования. На основании полученных биохимических данных и анализа ранее анонсированных геномов был сделан вывод, что ключевым ферментом, защищающим клетки большинства фототрофов от кислородных повреждений, является супероксиддисмутаз (СОД). Также в геномах многих анаэробных пурпурных и зеленых бактерий присутствуют гены, кодирующие несколько типов пероксидаз.

Необходимо отметить, что биохимические и генетические механизмы сложных и тонко регулируемых адаптивных ответов строго анаэробных микроорганизмов на окислительные стрессы, эволюцию ферментов антиоксидантной защиты, а также значение феномена аэротолерантности многих анаэробных микроорганизмов для различных природных экосистем начали активно исследовать только в последние несколько лет. Фундаментальную научную значимость этих вопросов, в том числе для изучения повреждений клеток всех живых организмов активными формами кислорода, а также для разработки новых перспективных антиоксидантов, трудно переоценить. Биохимические и молекулярно-биологические исследования ферментов антиоксидантной защиты в клетках строгих анаэробов также тесно связаны с изучением экологии и филогенетического состава микробных сообществ, существующих на границе окисленных и восстановленных зон, в частности, в водах меромиктических водоёмов и морских донных осадков.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СЕРИНОВОГО ЦИКЛА У МЕТАНОТРОФОВ I ТИПА

Бут С. Ю., Егорова С. В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
ФИЦ «Пушкинский Научный Центр Биологических Исследований РАН», Пушкино
flash20063@rambler.ru

В последние годы в биотехнологической промышленности отмечается рост интереса к метанотрофным бактериям. Это связано с их способностью использовать дешевый субстрат — метан — в качестве источника углерода и энергии, при этом служить продуцентами целого ряда ценных продуктов (белок одноклеточных, эктоины, биоразлагаемые пластики). Понимание особенностей функционирования метаболических путей у метанотрофов важно для их

успешного применения в качестве катализаторов конверсии метана в полиуглеродные соединения и генетической модификации с целью расширения их биосинтетического потенциала. Метанотрофы ассимилируют углерод метана в форме формальдегида, формиата или CO_2 в одном из трех путей: рибулозомонофосфатном (I морфотип), сериновом (II морфотип) или цикле Кальвина (филум *Verrucomicrobia*), или в различном сочетании этих путей. Метанотрофы, относящиеся к классу *Gamma*proteobacteria, используют наиболее энергетически эффективный рибулозомонофосфатный цикл в качестве основного пути C1-ассимиляции, однако биоинформатический анализ выявил гены, кодирующие ферменты серинового пути, функциональность и роль которого оставалась неясна.

У метанотрофа I типа *Methylotheobacterium alcaliphilum* 20Z, являющегося модельной системой при изучении метаболизма данной группы микроорганизмов, были инактивированы гены ключевых ферментов серинового цикла: серин-глиоксилатаминотрансферазы (*sga*), гидроксипируватредуктазы (*hpr*) и малил-КоА лиазы (*mcl*). У мутантов проанализированы ростовые характеристики, а также метаболические и экспрессионные профили при росте клеток на метане или метаноле. У штаммов *sga* и *sgahpr*, растущих на метаноле, обнаружены повышенные уровни формальдегида в среде культивирования, изменения внутриклеточных концентраций ряда центральных метаболитов и аминокислот. Получены данные, указывающие на активацию серинового цикла при росте клеток на метаноле. Мутантный штамм *mcl* оказался не способным расти без добавления глицина в среду. Ауксотрофия мутанта свидетельствует о том, что малил-КоА лиаза является единственным путем синтеза глиоксилата, который, в свою очередь, является единственным прекурсором синтеза глицина. Таким образом, наши результаты впервые показали значимость серинового цикла для метаболизма метанотрофов I типа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-04-00493.

МЕТАТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ В ПАТОСИСТЕМАХ И КАРТИРОВАНИЕ СТАРТОВ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Ю. В. Гоголев, Н. Е. Гоголева, М. А. Сайганова, Е. В. Осипова, Х. Хамо, А. С. Балкин

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН

Изучение РНК бактерий методом высокопроизводительного секвенирования показало, что бактериальные транскриптомы устроены достаточно сложно. Значительную долю в них составляет неcodирующая РНК (нкРНК), которая представлена множеством вариантов, различающихся по происхождению, размеру молекул и копийности в клетке. Было показано, что некоторые нкРНК бактерий действуют в качестве негативных регуляторов многих генов, а также могут служить факторами иммунитета. Однако, функциональная роль большей части нкРНК бактерий остается не выясненной.

Сложность для изучения патосистем заключается в том, что в смешанных транскриптомах бактерий и организмов-хозяев бактериальная РНК, как правило, составляет несколько процентов. Разработка метода Cappable-Seq, основанного на селекции транскриптов, содержащих 5'-концевые трифосфаты, предоставляет дополнительные возможности для исследования сложных транскриптомов. Применение этого метода позволило нам провести секвенирование РНК патогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* и *Salmonella enterica* непосредственно в тканях и клетках эукариотических организмов-хозяев — *Nicotiana tabacum* L. и *Acanthamoeba castellanii* Neff соответственно. В результате была охарактеризована дифференциальная активность транскрипции бактериальной РНК в процессе развития инфекции, кроме того, проведено картирование сайтов инициации транскрипции с точностью до одного нуклеотида в клетках эукариот и в ответ на действие антибиотиков различного спектра действия. Показано, что количество сайтов инициации транскрипции для нкРНК многократно превышает количество картированных генов. Выявлено более 20 тысяч новых сайтов инициации транскрипции (TSS), проведена их классификация по положению относительно регу-

ляторных элементов генов и оперонов. Показана корреляция активности TSS с активностью генов, определенной методом RNA-Seq.

Эксперименты по секвенированию РНК проведены при поддержке РФФИ (проект № 17-14-01363). Микробиологическая часть работы выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ THERMOFILUM ADORNATUM 1910B

Заюлина К. С.¹, Малышева А. Д.², Кубланов И. В.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

²МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

zauylinakc@gmail.com

Гликозидазы гипертермофильных архей обладают такими свойствами, как высокие температуры катализа, термостабильность, устойчивость к детергентам, длительное время жизни, а также широкой субстратной специфичностью. Благодаря вышеперечисленным свойствам, они интересны для биотехнологии, однако из-за сложности культивирования архей до сих пор крайне слабо изучены. Ранее нами была выделена гипертермофильная архея *Thermofilum adornatum* 1910b, способная расти на различных полисахаридах, включая целлюлозу. С применением сравнительного геномного и протеомного анализов нам удалось обнаружить 4 белка: Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45, участвующих в разложении целлюлозы этой археей. Целью данной работы стало выделение и характеристика предполагаемых целлюлаз - Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45, а также определение их роли в гидролизе целлюлозы.

Все ферменты были получены в рекомбинантном виде и очищены с помощью аффинной хроматографии. С применением метода ДНСК для измерения редуцирующих сахаров, а также тонкослойной хроматографии для анализа продуктов гидролиза было показано, что Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45 способны гидролизовать карбоксиметилцеллюлозу и аморфную целлюлозу (линейные полисахариды с бета-1,4-гликозидной связью) при 85 °С и рН 5,6, являясь, таким образом, эндоглюканазами. Помимо этого, все 4 фермента гидролизуют -глюкан и лихенан (линейные полисахариды с чередующимися бета-1,4 и бета-1,3-гликозидными связями), но не способны разлагать полимеры глюкозы, связанные только бета-1,3-гликозидными связями, такие как курдлан и пахиман. Ферменты Cel25, Cel30 и Cel40 обладают еще и экзоглюканазной и бета-гликозидазной активностями. Кроме того, оказалось, что помимо линейных глюканов все исследуемые белки разлагают глюкоманнан, а Cel30, Cel40 и Cel45 способны разлагать ксилоглюкан.

Таким образом, нами было получено четыре фермента, участвующих в гидролизе различных полимеров глюкозы и маннозы, причем 3 белка - Cel25, Cel30 и Cel40 проявляли как эндо-, так и экзоглюканазные активности, в то время как Cel45 - только эндоглюканазную активность.

Работа поддержана грантом РФФИ #21-54-10006_КО_a.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА GH12 ИЗ МУЛЬТИДОМЕННОЙ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ THERMOCOCCUS SP. 2319X1

Клюкина А. А.¹, Заюлина К. С.¹, Лаврова В. Д.², Фролов Е. Н.¹, Кубланов И. В.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

²МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

alexandra.a.popova@gmail.com

В нашем недавнем исследовании была впервые показана способность гипертермофильной археи расти на ксилане, одном из основных компонентов клеточных стенок растений. Помимо ксилана, *Thermococcus* sp. 2319×1 способен расти на некоторых других полисахаридах, благодаря наличию мультифункциональной мультидоменной гликозидазы (МДГ). Возможность МДГ гидролизовать сахара, разнообразные по размеру и составу мономеров, обусловлена уникальной структурой доменов, включающей три каталитических GH5, GH12-1 и GH12-2 и два связывающих домена. Каталитические домены способны функционировать как самостоятельные ферменты. Целью данной работы было изучение структурно-функциональных характеристик домена GH12-2 и определение его роли в гидролизе различных субстратов.

В ходе работы смоделированы и проанализированы мутантные структуры GH12-2 с заменами аминокислотных остатков, предположительно входящих в активный центр фермента, на аланин. Моделирование показало возможное влияние ряда точечных мутаций на вторичную структуру GH12-2, а также на связывание субстрата и ионов кальция. Наиболее значительное влияние на вторичную структуру и каталитические свойства GH12-2 предсказано для мутаций E147A и E240A.

С помощью сайт-направленного мутагенеза было получено 22 рекомбинантных белка GH12-2 с заменами предсказанных значимых аминокислотных остатков. Измерения ферментативной активности и стабильности фермента GH12-2 и всех полученных мутантных белков показали, что ряд замен, в частности E30A, N32A, W34A, N85A, K83A и N86A, влияют на термостабильность и снижают активность ферментов по отношению к бета-глюкану и лихенану, а замены E147A, E236A и E240A приводят к полной потере каталитических свойств, характерных GH12-2.

Определение функциональной роли аминокислотных остатков способствует пониманию возможных молекулярных механизмов термостабильности и катализа архейных гликозидаз.

Работа поддержана грантом РФФИ #21-54-10006 Ко_а.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ МАГНИТОТАКТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА НА ПРИМЕРЕ БАКТЕРИЙ ФИЛУМОВ *NITROSPIROTA* И *DESULFOBACTEROTA*

Козяева В. В.^{1*}, Узун М. М.^{1,2}, Груздев Д. С.³

¹Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

*vkoziaeva@mail.ru 89267993212

²МГУ им. М. В. Ломоносова

³SciBear LLC, Таллин, Эстония

Одним из значимых вопросов в изучении магнитотактических бактерий (МТБ) является вопрос об их происхождении и эволюции. Считается, что последний общий бактериальный предок мог быть способен к биоминерализации магнетосом. Также предполагается, что происходило преимущественно вертикальное наследование при множественных независимых потерях магнетосомного геномного кластера (МГК) у разных филогенетических групп. В поддержку такого сценария говорит отсутствие данных о горизонтальном переносе МГК между филумами.

Несмотря на то, что филум *Nitrospirota* является вторым по изученности среди МТБ, мало чего можно сказать об эволюции их магнетосомных генов. Недавно были обнаружены характерные для *Nitrospirota* ман гены у некоторых *Desulfobacterota*, что является довольно интересным открытием. При изучении разнообразия МТБ из озера Белое Бордуковское были обнаружены МТБ как филума *Nitrospirota*, так и филума *Desulfobacterota*. Это говорит о том, что МТБ обоих филумов населяют одну и ту же экологическую нишу, тем самым делая возможным перенос магнетосомных генов между ними.

Чтобы проверить эту теорию, был проведен сравнительный анализ геномов представителей этих филумов. Были секвенированы геномы МТБ из озера Белое Бордуковское с ис-

пользованием технологий Illumina и Nanopore. После биоинформатической обработки данных было получено 3 новых генома МТБ: LBB_01, LBB_02 и LBB_04. Первые два, LBB_01 и LBB_02, принадлежали филуму *Nitrospirota*, а LBB_04 – филуму *Desulfobacterota*. В геноме LBB_04 были найдены *map* гены. Было построено филогеномное дерево на основе 120 конкатенированных последовательностей однокопийных маркерных белков всех доступных геномов *Nitrospirota* и *Desulfobacterota* с полнотой сборки > 90%. Также было построено дерево на основе конкатенированных последовательностей магнетосомных белков АВКМРQ. Далее проводили реконструкцию полученных деревьев с помощью программ GeneRax, Notung, RangerDTL с целью реконструирования возможных эволюционных путей генов МГК между *Desulfobacterota* и *Nitrospirota*. В результате был детектирован интерфилумный перенос между МТБ семейства *Syntrophaceae* филума *Desulfobacterota* и *Nitrospirota*. Возможность интерфилумного переноса магнетосомных генов ставит под вопрос теорию того, что последний общий бактериальный предок был магнитотактическим. Таким образом, следует более внимательно относиться к теориям о происхождении МТБ.

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ НЕЙРОТОКСИЧНОЙ НЕБЕЛКОВОЙ АМИНОКИСЛОТЫ БЕТА-N-МЕТИЛАМИН-L-АЛАНИНА В МЕТАБОЛИЗМЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ – ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД

Кокшарова О.^{1,2}, Бутенко И.³, Побегуц О.³, Сафронова Н.¹, Говорун В.³

¹НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

²НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва

³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Способность синтезировать метаболиты возникла в эволюции микроорганизмов задолго до появления высших форм жизни. Предполагается, что эти молекулы могут иметь биологические функции, позволяющие микроорганизмам выживать в изменяющихся экологических условиях. Некоторые из этих соединений (пептиды, небелковые аминокислоты и алкалоиды) токсичны для человека, что делает актуальными исследования причин и условий синтеза этих молекул, их биологической роли и механизмов действия на живые клетки. Наша работа нацелена на выяснение особенностей регуляторного действия небелковой аминокислоты бета-L-аланина (ВМАА) на экспрессию белков цианобактерии *Nostoc sp.* PCC 7120 с помощью методов протеомики. С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) были идентифицированы 1567 различных белков этой цианобактерии. Сравнивались протеомы контрольных клеток (не обработанных ВМАА) и клеток, к которым добавляли ВМАА (20 мкМоль) в трех условиях роста, отличающихся по доступности связанного азота. Протеомные данные позволили установить, что добавление ВМАА к клеткам в диазотрофных условиях роста приводит к сильному (до 80 %) подавлению экспрессии субъединиц фермента нитрогеназы, отвечающего за осуществление процесса азотфиксации; резко снижается содержание 18 белков, входящих в состав комплексов обеих фотосистем (ФС1 и ФС2), цитохром-b6f-комплекса, антенных пигментных комплексов. Снижается экспрессия субъединиц NAD(P)H-хинон оксидоредуктазы и АТФ-синтазного комплекса. Наиболее существенное различие в экспрессии белков при сравнении действия ВМАА в условиях голодания по азоту и в условиях избытка азота состоит в регуляции ключевого регуляторного белка PII. Во время азотного голодания экспрессия этого белка подавляется, но она активируется в богатых азотом условиях роста. Можно сделать вывод о том, что добавление ВМАА к клеткам цианобактерии приводит к дисбалансу энергии и метаболитов азота и углерода, что индуцирует серьезный внутриклеточный стресс. Он проявляется в повышенном содержании активируемых стрессом белков, белков SOS-ответа и ферментов репарации ДНК, различных протеаз и, в конечном счете, ведет к апоптозу. Полученные результаты позволяют сформулировать гипотезу о возможном экологическом аспекте действия ВМАА на развитие сообществ цианобактерий. В периоды жесткой конкуренции за источники питательных веществ различные представители цианобактерий

и диатомовых водорослей могут использовать ВМАА в качестве аллелопатического инструмента для контроля численности цианобактериальных популяций. Клетки азотфиксирующих цианобактерий подвергаются лизису уже в присутствии микромолярных количеств ВМАА. В результате из их погибших клеток высвобождаются растворенные органические соединения, в которых нуждается сообщество микроводорослей.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО БЕЛКА Л5 НА ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕШНЕМЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER SP. XL1*

Кудрякова И. В., Афошин А. С., Ивашина Т. В., Сузина Н. Е., Леонтьевская Е. А.,
Леонтьевская (Васильева) Н. В.

Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН,
ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино
adm@ibpm.ru

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter sp. XL1* образует внешнемембранные везикулы и секретирует с их помощью фермент Л5 (*AlpV*) – это один из пяти известных бактериолитических ферментов, продуцируемых этой бактерией, которые гидролизуют клетки различных микроорганизмов, в т. ч. и патогенных штаммов. Везикулы, содержащие этот фермент, обладают мощным антимикробным действием в отношении бактерий (в т. ч. штаммов MRSA) и мицелиальных грибов-фитопатогенов, дрожжей. Использование везикул в качестве лекарственного средства для лечения сибиреязвенной инфекции и стафилококкового сепсиса приводило к полному выздоровлению экспериментальных животных. В связи с этим, актуальным было всестороннее изучение везикул *Lysobacter sp. XL1*, включая и их биогенез. Ранее нами было установлено, что *Lysobacter sp. XL1* образует несколько субпопуляций везикул, среди которых есть отдельная субпопуляция, содержащая фермент Л5. Были получены косвенные данные, указывающие на участие фермента Л5 в биогенез этой субпопуляции везикул. Целью данной работы было доказать влияние бактериолитического фермента на биогенез везикул у *Lysobacter sp. XL1*. Для доказательства этого необходим генетический подход – нокаут гена *alpV*.

Для введения мутации в геном *Lysobacter sp. XL1* на основе суицидного вектора pJQ200SK сконструирована плаزمид, содержащая фрагмент ДНК с делеционным вариантом *alpV*. Плазмиду вводили в клетки *Lysobacter sp. XL1* методом электропорации с отбором меродиплоидных клонов. В результате разрешения меродиплоидов отобраны $Suc^R Tc^R Gm^S$ клоны, в которых произошел двойной обмен между мутантным и диким аллелями гена *alpV*. Наличие делеции в гене *alpV* подтверждено методом ПЦР и секвенированием. Анализ бактериолитической активности выявил, что по сравнению с диким типом литическая активность мутантного штамма была в 1,3 раза меньше. Методом электронной микроскопии, а также аналитическими методами установлено, что мутантный штамм образует меньшее количество везикул, изменилось соотношение размеров производимых везикул и степень их наполненности, практически полностью утратились литические свойства везикул.

Данный результат свидетельствует в пользу участия бактериолитического белка Л5 в процессе формирования везикул *Lysobacter sp. XL1*. Следует отметить методическую ценность полученных результатов для будущего развития молекулярно-генетических исследований бактерий рода *Lysobacter*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00086)

ЭКОГЕНОМИКА СООБЩЕСТВ БАКТЕРИОФАГОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КИШЕЧНЫМ МИКРОБИОМОМ ЛОШАДЕЙ

Летаров А. В., Бабенко В. В., Куликов Е. Е., Millard A., Летарова М. А., Спасская Н. Н.

Институт Микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА РФ, Москва
University of Leicester, Leicester, UK

Зоологический музей биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Исследования вирусной составляющей являются одним из важнейших направлений изучения микробиома кишечника человека. В результате масштабных усилий десятков научных групп разнообразие, динамика, индивидуальная вариабельность и биогеография сообществ бактериофагов фекалий людей (исследуемых как проксикишечного сообщества) в достаточной мере охарактеризованы. В то же время, структура и динамика сообществ бактериофагов в кишечнике других видов млекопитающих не находились в фокусе специализированных исследований. С помощью методов метагеномики, культуральных методов и электронной микроскопии мы изучили особенности некультивируемых вирусных сообществ днДНК

содержащих вирусов фекалий лошадей. Мы сравнили виромы от нескольких групп лошадей, включая популяции животных, содержащихся на городской конюшне, на конюшне в сельской местности с большой долей времени на свободном выпасе, а также одичавших лошадей, включая популяцию, изолированную на острове в течение нескольких десятилетий. В стадии обработки находится материал еще из нескольких популяций.

Свойства виромов фекалий лошадей от описанных характеристик виромов фекалий человека. Вирома лошадей в меньшей степени индивидуальны. Имеющиеся данные позволяют предположить значительный вклад горизонтального переноса вирусных генотипов между индивидуумами. Одновременно отмечается более высокий уровень разнообразия, как в смысле репертуара фаговых генотипов, так и равномерности их распределения. Ни в одном из исследованных индивидуальных виромов лошади не было обнаружено гипер-представленных вирусных генотипов, которые могли бы «сравниться», например, с crAssphage – подобными вирусами в виромах фекалий людей. Общее число генотипов, входящих в состав вирома лошади, по-видимому, очень велико. Не более 9 % ридов вошли в состав контигов > 5 kbp, и при этом порядка 2 Mbp наиболее представленных неперекрывающихся последовательностей (что соответствует 15–50 фаговым геномам) рекрутируют 4–9 % ридов.

В среднесрочной и краткосрочной динамике виромов представленность большинства генотипов достаточно стабильна, однако имеется и доля таких, представленность которых резко изменяется.

Полученные данные позволяют предположить, что существуют несколько дискретных состояний виромов, между которыми происходят сравнительно быстрые переключения. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что экология бактериофагов в кишечном сообществе лошадей существенно отличается от экосистемы кишечника человека. Можно предположить, что разные виды млекопитающих могут быть поделены на несколько (не менее трех) типов по особенностям микробной экологии кишечных экосистем. Требуется более широкое исследование, чтобы идентифицировать и описать эти типы более точно.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-29-13029.

ЛАЗЕРНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКРОБНЫХ СИСТЕМ: ВОЗМОЖНОСТИ И РЕЗУЛЬТАТЫ.

Минаев Н. В.

*Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.
minaevn@gmail.com*

Введение

Представляется оригинальная технология Лазерной Инженерии Микробиологических Систем (ЛИМС) для выделения и пространственного переноса гелевых микрокапель содер-

жащих бактерии, клетки и их агрегаты с помощью коротких лазерных импульсов.

Методы исследования

Подход основан на методе прямого лазероиндуцированного переноса: под действием лазерных импульсов реализуется печать (пространственный перенос) микрокаплями геля, содержащего живые микробиологические объекты. Технология реализована на программно-аппаратных лазерных комплексах, разработанных и созданных в Институте фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Разработанные автономные комплексы включают изолированный бокс с настраиваемой атмосферой, что позволяет проводить печать в особых условиях (анаэробноз, заданная температура и др.) и вести работу, например, с экстремофильными микроорганизмами.

Результаты и обсуждение

Получены новые научные результаты, которые показали существенное увеличение таксономического разнообразия микроорганизмов, выделяемых из почв; возможность разделения синтрофных (симбиотических) микроорганизмов и микроорганизмов со значительно отличающимися темпами роста; выделены редкие штаммы микроорганизмов, в т. ч. анаэробных; разработаны подходы к нанесению биопленок из микроорганизмов, способных к электрогинезу, на электрохимические чипы; ЛИМС позволяет инициировать размножение «спящих» живых систем.

Заключение

Показано, что технология ЛИМС позволяет значительно увеличить разнообразие культивируемых микроорганизмов в сравнении со стандартными методами микробиологического посева, а также позволяет выделять монокультуры ранее не описанных или трудно культивируемых микроорганизмов из природных консорциумов без использования специально подобранных селективных сред. Представленный подход востребован для выделения биологически активных веществ и новых антибиотиков, а также создания тканеинженерных конструкций для задач регенеративной медицины.

Работы ведутся при поддержке Российского научного фонда – грант РФФ № 20-14-00286. Минаев Н. В. является получателем стипендии Президента Российской Федерации № СП-2728.2019.4.

ФОСФОНАТЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПЕКТОБАКТЕРИЙ

Парфирова О. И.¹, Горшков В. Ю.^{1,2}, Петрова О. Е.¹, Смолобочкин А. В.³,
Исламов Б. Р.¹, Гоголева Н. Е.^{1,2}, Гоголев Ю. В.^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН

²Казанский (Приволжский) федеральный университет

³Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН
Parfirovaolga.i@gmail.com

Фосфор является одним из важнейших элементов природы и играет важную роль во многих биологических процессах. Одним из источников фосфора в природе являются фосфонаты – соединения, характерной особенностью которых является наличие связи углерод-фосфор. По разным данным, 10 % микроорганизмов содержат гены, кодирующие предполагаемые пути биосинтеза фосфонатов, и около 40 % бактерий кодируют один или несколько путей катаболизма фосфонатов. Это может свидетельствовать о важной роли фосфонатов в биосфере.

Кластер генов, аннотированных как ферменты метаболизма фосфонатов, был обнаружен и в геноме фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*SCRI 1043 (*Pba*). С помощью транскриптомного анализа мы показали, что экспрессия данных генов, активируется в условиях *in planta* и наиболее активно на поздней стадии колонизации растения, сопряженной с развитием мягкой гнили. Ранее было установлено, что фосфонат пантафос фитопатогена *Pantoea ananatis* обладает гербицидными свойствами и повышает вирулентность патогена. Поэтому целью данной работы было установить, способны ли фитопатогенные пектобактерии продуцировать фосфонаты, и могут ли они выступать в качестве факторов вирулентности.

Чтобы проверить, действительно ли пектобактерии продуцируют внеклеточные фосфонаты, были подобраны условия *in vitro*, которые индуцируют экспрессию генов, связанных с фосфонатами, и проведена экстракция предполагаемых фосфонатов из супернатантов культур пектобактерий. Для обнаружения фосфонатов была использована ЯМР-спектроскопия по фосфору. Спектры ЯМР ^{31}P для полученных образцов показали сигналы, характерные для фосфонатов.

Для получения мутанта по генам, связанным с биосинтезом фосфонатов, применяли локус-специфический мутагенез. Мутант с делецией *fom1* (фосфоенолпируватфосфомутаза) не продуцировал эти метаболиты.

Таким образом, мы впервые детектировали внеклеточные низкомолекулярные фосфонаты у фитопатогенных пектобактерий. В настоящее время мы проводим сравнительный анализ стратегии взаимодействия растений с дикой и *fom1*-мутантной формами *Pectobacterium atrosepticum* и проверяем их вирулентность.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00194.

МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОГРЕСС ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ACINETOBACTER*

Петрова М. А.*, Миндлин С. З.

Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва
*petrova@img.mos.ru

Штаммы *Acinetobacter* (А.) представляют особый интерес в связи с огромным разнообразием мест их обитания и множеством обнаруженных у них метаболических способностей. Так среди них имеются штаммы, живущие в местах разлива нефти и способные к эффективной деградации углеводородов, патогены человека, устойчивые к различным антибиотикам, ризосферные бактерии и штаммы, обитающие в биореакторах и кишечнике насекомых. Наиболее изученным видом А. является патоген человека *A. baumannii* – возбудитель внутрибольничных инфекций, штаммы которого чаще всего обладают исключительно широкой множественной лекарственной устойчивостью. В последние годы, благодаря развитию и широкому применению NGS, в нашей и других лабораториях получены данные, проливающие свет на механизмы, обеспечивающие удивительную пластичность штаммов А. Доклад посвящен обобщению и обсуждению собственных и литературных данных о механизмах горизонтального переноса генов, вносящий наибольший вклад в адаптацию представителей данного рода.

Оказалось, что многие штаммы А. содержат многочисленные плазмиды. Плазмиды служат платформой, на которой постоянно происходит обмен генетическим материалом, с участием различных мобильных элементов, а также различных рекомбинационных систем. В результате на плаزمиде происходит сборка новых комбинаций генов, необходимых для приспособления к условиям среды. Сами плазмиды способствуют быстрому распространению среди штаммов А. тех генов, которые необходимы для успешного выживания в конкретных условиях. Сравнение геномов родственных плазмид современных клинических и древних мерзлотных штаммов позволило ясно проследить эти процессы.

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

Таким образом, пластичность и биологический прогресс представителей рода А. в основном связана с постоянным активным горизонтальным переносом плазмидных генов.

АДАПТИВНАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ БАКТЕРИЙ – ФЕНОМЕН, МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Петрова О. Е. *, Парфирова О. И., Горшков В. Ю.

Казанский институт биохимии и биофизики,
ФИЦ «Казанский Научный Центр РАН», Казань, kibmail@kibb.knc.ru
*poe60@mail.ru

Адаптивные реакции бактерий регулируются на популяционном уровне при участии систем межклеточной коммуникации и требуют высокой плотности клеток. Однако, при плотности популяции ниже уровня кворума, бактерии способны ее увеличивать до порогового значения даже в отсутствие экзогенного ростового субстрата – адаптивная пролиферация (АП).

Целью исследования явилась характеристика физиологических и молекулярных аспектов феномена увеличения плотности популяции при низком исходном титре клеток в условиях голодания – АП, и поиск медиаторов межклеточной коммуникации, участвующих в терминации этого процесса, на примере фитопатогенной энтеробактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*).

Дикий тип и различные мутанты *Pba* при высокой (10^6 – 10^9 кл/мл) или низкой (10^1 – 10^5 кл/мл) плотности популяции подвергались углеродному/азотному голоданию. Проводился мониторинг КОЕ и геномных копий, экспрессии целевых генов, динамики АГЛ, морфологии, перекрестной устойчивости, вирулентности с использованием электронной и конфокальной микроскопии; количественной ПЦР; анализа РНК-Seq; биолюминисцентных штаммов.

При низкой клеточной плотности в условиях голодания происходило увеличение КОЕ бактерий до порогового уровня 10^6 кл/мл. Терминация адаптивной пролиферации при голодании была связана с формированием сигнального фона, состоящего из медиаторов систем кворума АГЛ и АИ-2, а также повышенной компетентностью голодающих клеток к этим сигналам. Активация межклеточной коммуникации приводила к индукции стрессового, в т.ч. строгого, ответа. Голодающие культуры длительно персистировали в неблагоприятных условиях, формировали устойчивый фенотип, сохраняли вирулентность. Мутации по генам синтаз АГЛ *exrI* или АИ-2 *luxS* существенно не влияли на пролиферацию бактерий, но снижали их перекрестную устойчивость.

Т. об., адаптивная пролиферация является, вероятно, одной из физиологических программ адаптации бактерий в рамках концепции существования нескольких (или даже множества) адаптивных стратегий у отдельно взятого вида микроорганизма. Терминация АП по достижении бактериальной популяцией плотности, необходимой для межклеточной коммуникации, позволяет экономить внутренние энергетические ресурсы клеток, за счет которых осуществляется клеточное деление. Исследование поддержано РФФИ (грант 20-34-70043).

ФЕРМЕНТЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ У ОБЛИГАТНЫХ МЕТАНОТРОФОВ

Розова О. Н., Екимова Г. А., Решетников А. С., Хмеленина В. Н., Мустахимов И. И.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
ФИЦ «Пушкинский Научный Центр Биологических Исследований РАН», Пушкино
rozovaolga1@rambler.ru

Бактерии, использующие метан в качестве источника углерода и энергии, не способны к росту на углеводных субстратах, при этом обладают ферментами утилизации свободной глюкозы. В данном исследовании у облигатных метанотрофов *Methylovulumicrobium alcaliphilum* и *Methylobacter luteus* изучали свойства и роль ферментов глюконатного шунта – глюкозодегидрогеназы (Gdh) и глюконаткиназы (GntK). Gdh метанотрофов – гомотетрамеры, строго специфичные к глюкозе, предпочитают использовать в качестве кофактора NAD^+ , по сравнению

с NADP⁺. Gdh из *M. alcaliphilum* наиболее активна при pH 10 ($V_{\max} = 95$ Ед/мг белка), имеет низкое сродство к глюкозе ($K_m = 92 \pm 4$ мМ), в то же время, фермент из *Mb. luteus* максимально активен при pH 8,5 ($V_{\max} = 43$ Ед/мг белка) и имеет относительно высокое сродство к углеводному субстрату ($K_m = 16 \pm 1$ мМ). Инактивация генов, кодирующих глюконаткиназу и глюкокиназу (*gntk*/*glk*), приводила к накоплению глюконата в клетках мутантного штамма *M. alcaliphilum*. В штаммах с генотипами *glk*⁻, *gntk*/*glk*⁻ или *gdh*/*glk*⁻ наблюдалось существенное снижение содержания гликогена и возрастание уровня трегалозы, а в клетках с инактивированными генами глюкокиназы и глюкозодегидрогеназы (*gdh*/*glk*⁻), кроме того, значительно возрастал уровень глюкозы. Биоинформатический анализ генома свидетельствует о том, что единственным источником трегалозы и глюкозы в клетках *M. alcaliphilum* является распад гликогена. Обнаружение следовых количеств глюкозы и трегалозы у штамма дикого типа указывает на идущие параллельно процессы синтеза и деградации гликогена. Таким образом, у *M. alcaliphilum* глюкоза, образуемая в результате деградации гликогена, утилизируется в основном высокоспецифичной к глюкозе глюкокиназой. При избыточном накоплении глюкозы, например, при ингибировании активности глюкокиназы ADP ($K_i = 2,3$ мМ), глюкоза утилизируется с участием Gdh, GntK и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, что приводит к образованию рибулозо-5-фосфата, акцептора формальдегида в ключевой реакции ассимиляции углерода. Следовательно, метаболизм глюкозы через глюконатный шунт может служить анаплеротическим механизмом восполнения интермедиатов рибулозомонофосфатного цикла, мобилизуя клеточные резервы углеводов при колебаниях содержания углеродного субстрата в окружающей среде.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00728А.

НОВЫЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА БЕСЦВЕТНЫХ НИТЧАТЫХ СЕРОБАКТЕРИЙ

Руденко Т.^{1,*}, Тарлачков С.², Трубицина Л.², Грабович М.¹

¹Воронежский государственный университет, office@main.vsu.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, ФИЦ «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, adm@ibpm.ru

Введение: Нитчатые бесцветные серобактерии являются трудно культивируемыми организмами. Удачные попытки выделения единичных чистых культур этой физиологической группы бактерий, получение геномных сиквенсов и их анализ позволили выявить ряд особенностей метаболизма соединений серы и углерода, что в свою очередь позволило приблизиться к пониманию уникальности этих организмов.

Материалы и методы: методы биоинформатики, количественная ОТ-ПЦР, ВЭЖХ-МС/МС, экспрессия гена в гетерологичной системе.

Результаты и обсуждение: Штамм *Beggiatoa leptomitiformis* D-401 не способен к литотрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы и к накоплению элементной серы внутри клеток в отличие от штамма D-402^T. Оба штамма имеют идентичные гены ферментов, участвующих в окислении восстановленных соединений серы. Было показано, что у штамма D-401 был нарушен ген, кодирующий белок оболочки серных глобул за счет встраивания транспозона, что может являться причиной облигатной органотрофии у этого штамма.

Анализ геномов 10 видов *Thiothrix*, из которых 7 нами были выделены / описаны, впервые позволил установить особенность углеродного метаболизма — отсутствие классической малатдегидрогеназы (МДГ). Вместо неё у всех штаммов выявлена малат:хинон-оксидоредуктаза (MQO), которая обеспечивает замкнутость ЦТК и глиоксилатного цикла, тем самым позволяет этим организмам существовать в гетеротрофных условиях. Для получения рекомбинантного белка MQO ген *mqr* из штамма *Thiothrix litoralis* AS клонирован в вектор pET-22b(+) и экспрессирован в клетках *Escherichia coli* C41 (DE3). Получен рекомбинантный белок MQO. Изучение свойств фермента позволит обосновать его присутствие у серобактерий, обитающих в проточных сероводородных биотопах.

Выводы: Основываясь на сравнительной геномике, ОТ-ПЦР и ВЭЖХ-МС/МС, мы доказали, что для литотрофного роста *B. leptomitiformis* строго необходимым условием является наличие гена, кодирующего белковую оболочку серных глобул. В противном случае образующаяся сера (до 70 % от сухого веса) в виде R-Sn-R, не «обернутая» в белковую оболочку вызывает нарушение метаболических процессов.

Примечательной особенностью представителей рода *Thiothrix* является отсутствие классической МДГ и присутствие MQO. По энергетическому потенциалу MQO намного эффективнее МДГ, что, при общей низкой активности ферментов ЦТК, позволяет выживать *Thiothrix* в гетеротрофных и миксотрофных условиях.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект 20-14-00137).

МИКРОБНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ОРГАНОФОСФОНАТОВ: НЕИЗВЕСТНАЯ ЧАСТЬ ГЛОБАЛЬНОГО КРУГОВОРОТА ФОСФОРА

Свиридов А. В.¹, Эпиктетов Д. О.¹, Тарлачков С. В.^{1,2}, Шушкова Т. В.¹,
Леонтьевский А. А.¹

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН

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

Фосфор участвует в биологическом круговороте не только в виде фосфатов, но и в составе органофосфонатов (ОФ), содержащих ковалентную связь C-P³⁺. Эти соединения выполняют роль антибиотиков, запасных веществ, компонентов мембран. В ряде экосистем ОФ представлена основная часть биодоступного фосфора, а ферменты синтеза и катаболизма ОФ найдены практически у всех таксонов бактерий. Антропогенные ОФ, такие как гербицид глифосат (ГФ), расцениваются как стойкие загрязнители окружающей среды. Полноценная научная картина метаболизма этих соединений не сформирована, поэтому изучение разнообразия ферментов деградации ОФ внесет существенный вклад в понимание биосферного круговорота фосфора и поведения синтетических ОФ в природной среде.

В работе использовали деструкторы ОФ, относящиеся к видам *Achromobacter insolitus*, *A. aegrifaciens* и *Ochrobactrum anthropi*. Таксономическую принадлежность определяли путем анализ гена *NrdA* и последовательностей 16S РНК. Деградацию ОФ изучали по наличию характерных метаболитов методами ВЭЖХ и ТСХ. Активность ферментов катаболизма ОФ определяли спектрофотометрически. Полногеномное секвенирование проводили на платформе Illumina NovaSeq 6 000, для сборки геномов использовали SPAdes версии 3.14.0, аннотировали с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. Рекомбинантные фосфонатазы получали путем клонирования генов *PhnX* в вектор pET-22b и экспрессии в штамме *E. coli* BL21 (DE3).

Показано, что биодеструктивные способности бактерий в отношении ОФ зависят не только от наличия генов ферментов катаболизма, но и от физиологических характеристик конкретного штамма. Отмечено разнообразие путей деградации ОФ у бактерий, выявлены известные и гипотетические ферменты. В геномах *A. aegrifaciens* и *A. insolitus* обнаружены фосфонатазные и C-P лиазные опероны с необычной организацией, но не выявлены гены ГФ-оксидоредуктазы и ГФ-ацетилтрансферазы, несмотря на способность бактерий осуществлять соответствующие реакции. Впервые показана специфическая индукция фосфонатазы при росте бактерий на средах с ГФ. У штамма *A. insolitus* Kg 19 впервые обнаружено разделение фосфонатазы на две изоформы, характерное и для нативного, и для рекомбинантного фермента.

Полученные данные указывают на неполноту литературных данных о путях катаболизма ОФ, которые отличаются высокой вариативностью и включают в себя ряд неизвестных ферментов, катализирующих ключевые реакции.

РОЛЬ ОСМОЛИТНОЙ СИСТЕМЫ В АДАПТАЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ-ЭКСТРЕМОФИЛОВ

Терёшина В. М.¹, Данилова О. А.¹, Януцевич Е. А.¹, Бондаренко С. А.^{1,2},
Георгиева М. Л.^{2,3}, Биланенко Е. Н.²

¹Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, info@fbras.ru

²МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва,
info@mail.bio.msu.ru

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе, Москва, instna@sovintel.ru

Среди экстремофилов выделяют группы по оптимальным условиям роста, включая температуру (психрофилы, термофилы), pH (ацидофилы и алкалофилы), ионную силу (галофилы), активность воды (ксерофилы). По современным представлениям органические осмолиты, являются не только «совместимыми соединениями» (compatible solutes), но и цитопротекторами. У грибов осмолиты представлены, в основном, трегалозой и полиолами. Трегалоза, как и полиолы, способна замещать воду в гидратных оболочках макромолекул, но, в отличие от полиолов, обладает способностью встраиваться и стабилизировать мембраны в условиях стресса. Особый интерес представляет изучение осмолитной системы у грибов-экстремофилов, эволюционно приспособленных к жизни в экстремальных условиях.

Цель работы – изучить состав осмолитов у экстремофильных грибов в оптимальных условиях и под действием различных стрессорных факторов. В качестве объектов исследования были выбраны алкалофилы *Sodiomyces tronii*, *S. alkalinus*, термофилы *Rhizomucor miehei*, *R. tauricus*, галоалкалотолерант *Emericellopsis alkalina*, галоксерофил *Aspergillus penicillioides*, ацидотолерант *Mollisia* sp. Осмолиты экстрагировали из биомассы горячей водой, удаляли белки и заряженные соединения, лиофильно высушивали и получали триметилсилильные производные сахаров, которые количественно анализировали методом внутреннего стандарта на ГЖХ.

У термофилов в оптимальных условиях на всех стадиях роста было обнаружено высокое содержание трегалозы, в отличие от следовых количеств у мезофилов, что показывает важное значение трегалозы для термофилии. Нами впервые обнаружено, что трегалоза играет большую роль и в алкалофилии. У алкалофилов количество трегалозы в мицелии варьирует от 4 до 10% от сухой массы в зависимости от возраста. Однако, в ответ на осмотический шок, несмотря на высокий уровень трегалозы, в мицелии *R. miehei* и *S. tronii* дополнительно накапливаются полиолы, что указывает на их необходимость для адаптации к стрессу. Для ацидотолеранта *Mollisia* sp впервые показано использование трегалозной защиты для адаптации к низким значениям pH.

Оптимум роста алкалогалотолеранта *E. alkalina* – pH 4-11 и 0,4М NaCl. В кислых условиях в составе осмолитов преобладает маннит, в высокощелочных условиях – арабит. Однако, при осмотическом воздействии 1М NaCl наблюдается резкий рост уровня другого полиола – эритрита. У галоксерофила *A. penicillioides* основным осмолитом в условиях низкой активности воды и 2М NaCl является глицерин.

Результаты исследования показали, что осмолитная система является ключевым звеном в адаптации к экстремальным условиям среды и к другим стрессорным факторам у грибов-экстремофилов.

ДВУХДОМЕННЫЕ ЛАККАЗЫ АКТИНОБАКТЕРИЙ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, СВОЙСТВА, РОЛЬ В ПРИРОДНЫХ ПРОЦЕССАХ

Трубицина Л. И.¹, Заварзина А. Г.², Лисов А. В.¹, Белова О. В.¹, Трубицин И. В.¹,
Леонтьевский А. А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино
adm@ibpm.ru

²Московский государственный университет, Факультет почвоведения, Москва,
soil.msu@mail.ru

Введение: двухдоменные (2д) бактериальные лакказы широко распространены у почвенных бактерий – актиномицетов. Известно, что ферменты принимают участие в процессах споруляции, синтезе меланина, устойчивости клеток к УФ. Благодаря способности 2д лакказ окислять широкий спектр фенольных соединений при нейтральных и щелочных значениях pH, было предположено возможное участие ферментов в процессах трансформации органического вещества почвы.

Материалы и методы: для получения рекомбинантных 2д лакказ гены были клонированы и экспрессированы в гетерологичной системе. Очистку проводили при помощи аффинной хроматографии. Характеристика ферментов проводилась с использованием метода спектрофотометрии, электрофореза. Гуминовые кислоты (ГК) дерново-подзолистой почвы, чернозема и торфа получали с использованием методов экстракции, высаливания, гель-фильтрации. Полимеризацию ГК фиксировали с помощью гель-фильтрации.

Результаты и обсуждение: были получены препараты рекомбинантных 2д лакказ из *Streptomyces anulatus* (SaSL) и *Streptomyces carpinensis* (ScaSL). Ферменты обладали высокой термостабильностью и щелочным pH-оптимумом окисления фенольных соединений. В результате окисления фенольных соединений, в том числе ГК, под действием лакказ при щелочном pH образуются хиноны и феноксирадикалы, которые способны подвергаться спонтанной полимеризации. SaSL и ScaSL эффективно трансформировали ГК, выделенные из дерново-подзолистой почвы, чернозема и торфа. Ферменты трансформировали ГК, увеличивая долю их высокомолекулярных фракций за счет низкомолекулярных фракций, что свидетельствовало о реакциях полимеризации при щелочных значениях pH. Так же SaSL и ScaSL сополимеризовали ГК с фенольными соединениями, широко распространёнными в почвах – феруловой и кофейной кислотами. Возможно, что полимеризация происходит из-за того, что окислительно-восстановительный потенциал лакказы может быть слишком низким, чтобы вызвать деполимеризацию ГК, и, следовательно, имели место только реакции полимеризации. Соответственно, 2д лакказы не способны катализировать расщепление полимерной цепи ГК, а способны катализировать только окисление фенольных структур ГК с их последующей полимеризацией.

Выводы: установлено, что 2д лакказы способны трансформировать ГК при щелочных значениях pH, вызывая их полимеризацию. Эти данные существенно расширяют наши представления о трансформации почвенных веществ актинобактериями.

РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ И ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК У *ESCHERICHIA COLI*

Тутукина М. Н.^{1,2,3}, Рыбина А. А.¹, Бессонова Т. А.², Казнадзей А. Д.³,
Кондрашов Ф. А.⁴, Озолинь О. Н.², Гельфанд М. С.^{1,3}

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «ПНЦБИ РАН».
142290, Московская область, Пущино

³Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН, Москва

⁴Австрийский институт науки и технологий (IST Austria), Клостернойбург, Австрия

Введение

Формирование биопленок является основной причиной хронических заболеваний и антибиотикорезистентности – около 80 % хронических инфекций мочеполового тракта вызваны труднодоступными для антибиотиков биопленками, сформированными уропатогенной *E. coli* (UPEC). Мастер-регулятор процесса формирования биопленок пока не найден. Задачей данного исследования был поиск ключевых факторов транскрипции, контролирующей подвижность и формирование биопленок кишечной палочкой, с целью дальнейшего подбора специфических эффекторов, способных моделировать их ДНК-связывающую активность и снижать интенсивность образования биопленок.

Материалы и методы

Делеционные мутанты были получены с помощью Gene doctoring. Транскриптомы секвенировали на платформе Illumina (50 SE). Филогенетические деревья были построены с использованием протокола максимального правдоподобия с бутстреп поддержкой. Интенсивность образования биопленок оценивали с помощью окраски кристаллическим фиолетовым.

Результаты и обсуждение

Поскольку известно, что для успешной колонизации организма хозяина кишечной палочке нужны пути Эшвелла и Энтнера-Дудорова, то, в первую очередь, были проверены их основные регуляторы – UxuR, ExuR и YjjM – и глобальный метаболический регулятор cAMP-CRP, для которого ранее было показано участие в модуляции процесса формирования биопленок. В штаммах с удаленными генами *ixuR* и *yjjM* были существенно активированы гены подвижности и ингибированы гены, связанные с образованием биопленок, включая ген основного регулятора CsgD. Эти наблюдения были полностью подтверждены физиологическими тестами, а с помощью филогенетического анализа было показано, что структуры UxuR и YjjM в штаммах дикого типа, UPEC и EPEC могут иметь отличия в С-концевом домене, что, по-видимому, коррелирует со способностью вызывать хронические инфекции и формировать биопленки. Несмотря на высокий уровень гомологии с UxuR, ExuR не принимает участие в регуляции данных процессов. Интересно, что при удалении *scr* экспрессия генов белков, вовлеченных в процессы образования биопленок, менялась не так сильно, как предполагалось.

Заключение

Таким образом, наши данные свидетельствуют о ключевой роли UxuR и YjjM в регуляции подвижности *E. coli* и способности к формированию биопленок, тогда как роль cAMP-CRP, ранее считавшегося одним из основных регуляторов, требует дополнительной проверки. Работа поддержана РФФ 18-04-00358.

ГЕНЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В СИНТЕЗ БИОПАВ В ШТАММАХ РОДОКОККОВ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ

Филонов А. Е., Пунтус И. Ф., Ахметов Л. И., Филатова И. Ю., Делеган Я. А.,
Керзь М. А., Титок М. А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
Пущино, adm@ibpm.ru

Белорусский государственный университет, Минск, bsu@bsu.by

Бактерии рода *Rhodococcus*, продуцирующие в присутствии n-гексадекана сурфактанты гликолипидной природы, способны снижать поверхностное натяжение и эмульгировать гидрофобные субстраты, повышая их доступность для биodeградации. Генетический контроль синтеза биоПАВ у родококков изучен недостаточно. Цель настоящей работы – осуществить первичный анализ генетических детерминант, продукты которых могут быть вовлечены в синтез биоПАВ гликолипидной природы у родококков-деструкторов углеводов (алкан-1-монооксигеназы и ацилтрансферазы).

Установлено, что в геноме *R. pyridinivorans* 5Ap присутствует два гена, детерминирующих синтез алкан-1-монооксигеназ, тогда как в геноме *R. erythropolis* F2 они представлены пятью копиями. В хромосоме *R. erythropolis* F2 выявлено 2 гена ацилтрансфераз.

Для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap методом направленного мутагенеза получены мутанты с нарушением двух структурных (*alkB*, *alkB2*) и одного регуляторного (*RalkB2*) генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ. Установлено, что мутанты не отличаются от исходных бактерий по количеству продуцируемых трегалолипидов, но характеризуются разной эмульгирующей активностью. Мутант с нарушением гена *alkB2* не эмульгировал n-гексадекан, а мутация, предположительно, нарушающая его регуляцию (*RalkB2*), приводила к снижению эмульгирующей активности в 1,6 раза. В то же время мутант *alkB* эмульгировал n-гексадекан в 1,5 раза более эффективно исходных бактерий.

Для бактерий *R. erythropolis* F2 разработаны специфические праймеры и с помощью RT-qPCR определен уровень экспрессии пяти генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ и двух генов, кодирующих синтез ацилтрансфераз. Установлено, что в присутствии n-гексадекана более чем в 5 раз увеличивалась экспрессия только двух генов *orf03818* (*alkB4*) и *orf04522* (*papA2*), соответственно кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназы и трегало-2-сульфатацилтрансферазы. На следующем этапе работы планируется инактивировать эти гены и сравнить эффективность биodeградации углеводов исходными и мутантными бактериями, что позволит оценить вклад биоПАВ в этот процесс.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00002\20 «Особенности синтеза поверхностно-активных соединений бактериями, эффективно утилизирующими нефть при пониженных и повышенных температурах».

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТРАНСАЛЬДОЛАЗНОГО ВАРИАНТА ЦИКЛА КАЛЬВИНА У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ

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

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва, evgenii_frolov_89@mail.ru

Восстановительный пентозофосфатный цикл является наиболее значимым путём ассимиляции неорганического углерода в современной биосфере. Последовательность его биохимических реакций была открыта в начале 1950-х годов под руководством М. Кальвина, однако недавно у термофильной хемолитоавтотрофной бактерии *Thermodesulfobium acidiphilum* нами был описан новый трансальдолазный вариант данного цикла. Целью настоящей работы является исследование распространения трансальдолазного варианта цикла Кальвина среди прокариот.

В ходе исследования диссимиляционной сульфатредукции в термальных источниках нами была изолирована и охарактеризована новая автотрофная сульфатредуцирующая бактерия *Desulfothermobacter acidiphilus*. В геноме данной бактерии, а также в геномах филогенетически наиболее близких к ней представителей родов *Ammonifex* и *Thermodesulfitimonas*, были выявлены гены кодирующие ферменты сразу двух путей фиксации CO₂ – трансальдолазного варианта цикла Кальвина и пути Вуда-Льюнгдаля. Отличительной особенностью трансальдолазного варианта цикла Кальвина в группе *Ammonifex-Thermodesulfitimonas-Desulfothermobacter* является наличие бифункциональ-

ной фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы/фосфатазы вместо двух отдельных ферментов, альдолазы и фосфатазы, функционирующих в трансальдолазном варианте цикла Кальвина у *T. acidiphilum*. Бифункциональность и однонаправленность данного фермента гарантирует быстрое преобразование термолабильных триозофосфатов в термостабильный фруктозо-6-фосфат, что имеет большое значение в условиях высоких температур.

Таким образом, в ходе данной работы нами было показано наличие генов нового варианта цикла Кальвина у термофильных бактерий *Ammonifex-Thermodesulfitimonas-Desulfothermobacter*, а также предприняты попытки определить какой из двух путей автотрофной фиксации CO₂ рабочий с применением протеомики и биохимических методов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект МК-2776.2021.1.4.

ФУНКЦИИ ПОЛИАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ПЕРСИСТЕНЦИИ *Escherichia coli*

Хаова Е. А.^{1,2}, Кашеварова Н. М.², Сидоров Р. Ю.^{1,2}, Ткаченко А. Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

²ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр,

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

akkuzina-elena510@mail.ru; (342)212-36-51

Персисторы — это малочисленная субпопуляция бактериальных клеток, которые, находясь в дормантном состоянии, обладают множественной антибиотикотолерантностью, а после прекращения воздействия антибиотика способны возобновлять рост. Благодаря этому персисторы являются причиной рецидивов инфекционных заболеваний. Формирование бактериальной персистенции — сложный процесс, обусловленный взаимодействием множества регуляторов, действующих на различных уровнях генной экспрессии. В данной работе исследуются следующие потенциальные факторы персистенции: регуляторы общего стрессорного ответа и голодания RpoS, RelA и SpoT; глобальные регуляторы генной экспрессии H-NS и StpA; факторы гибернации рибосом: Rmf, YqjD, Hpf, RaiA, RsfS, SRA, EttA. Цель работы — определить генно-экспрессионные профили *Escherichia coli* в модели перехода в стационарную фазу периодической культуры, а также роль метаболических факторов — полиаминов — в регуляции персистенции посредством модуляции генной экспрессии изучаемых групп генов.

Генную экспрессию исследовали на транскрипционном уровне методом ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, на трансляционном — с помощью сконструированных нами генных *lacZ*-слияний, на посттрансляционном — методом MALDI. Генные нокауты получены по Datsenko&Wanner. Частоту персистенции определяли по Keren I. et al., 2004.

На транскрипционном уровне экспрессии максимальный стимулирующий эффект полиаминов наблюдается при переходе *E. coli* в стационарную фазу (*rpoS*, *stpA*, *rmf*, *hpf*, *raiA*, *rsfS*, *sra*) и непосредственно в стационарной фазе (*hns*, *yqjD*, *ettA*), что совпадает с максимальным уровнем персистенции. На трансляционном уровне полиамины стимулируют экспрессию *rpoS* и *rmf* также преимущественно при переходе в стационарную фазу, тогда как *yqjD* и *stpA* — собственно в стационарной фазе. На посттрансляционном уровне полиамин-зависимый характер экспрессии показан также в отношении *stpA*. Мутанты $\Delta relA$, $\Delta relA\Delta spoT$, $\Delta rpoS$, Δrmf , $\Delta yqjD$ демонстрируют значительное снижение уровня персисторов в стационарной фазе по сравнению с диким типом, что подтверждает их роль в персистообразовании. Таким образом, полиамины участвуют в регуляции персистенции посредством модуляции генно-экспрессионных профилей *E. coli* при переходе в стационарную фазу.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы АА-АА-А19-119112290009-1.

МЕХАНИЗМЫ ФОТОЗАЩИТЫ У КАРОТИНОГЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS LACUSTRIS* (CHLOROPHYTA)

Чеканов К. А., Соловченко А. Е.

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии
chekanov@mail.bio.msu.ru

Зеленая одноклеточная водоросль *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae, Volvocales) является продуцентом каротиноида астаксантина, имеющего большое практическое значение. В ряде стран мира она культивируется в промышленных масштабах для получения этого пигмента. Накопление астаксантина индуцируется различными стрессовыми факторами или их сочетанием (яркий свет, дефицит минерального питания и т. д.). По современным представлениям синтез каротиноида является защитной программой клетки, запускаемой в хлопласте наряду с прочими протекторными механизмами [1].

Нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла является одним из основных защитных механизмов фотосинтезирующей клетки. Его смысл заключается в рассеивании в виде тепла той доли поглощенной световой энергии, которую клетка не может утилизировать [2]. Одной из мер оценки интенсивности протекания процессов нефотохимического тушения является параметр NPQ Штерна-Фольмера [2]. Ранее установлено, что параметр NPQ снижается при продувании культуры *H. lacustris* газо-воздушной смесью с повышенным содержанием CO₂ [3]. То есть, снижается интенсивность процессов регулируемой диссипации. Известно, что при действии яркого света кинетика NPQ имеет двухфазный характер. Сначала наблюдается монотонный рост параметра, а потом — его значения падают до нуля, то есть при длительном воздействии стрессовых факторов защита клетки осуществляется при помощи механизмов, отличных от нефотохимического тушения [3,4].

В настоящей работе изучали эффективность фотохимической утилизации в реакционных центрах фотосистем в зависимости от интенсивности действующего на клетки *H. lacustris* света. Исследования проводили путем анализа кинетики индукции флуоресценции хлорофилла а и пропускания света в ИК-области спектра. В целом, на ранних этапах стрессового воздействия клетки *H. lacustris* характеризовались более высокими значениями NPQ и более медленной темновой релаксацией данного параметра. Добавление нигерицина, снижающего трансмембранный протонный градиент тилакоидных мембран, приводило к снижению параметра NPQ, однако у клеток в состоянии стресса этот эффект был выражен меньше. Для более детального анализа возможных механизмов регулируемого нефотохимического тушения использовали данные дифференциальной транскриптомики [5]. Определено, что на начальных этапах действия стрессовых факторов высокие значения NPQ поддерживались преимущественно за счет экспрессии белков PsbS и LhcsR [5]. Затем стрессоустойчивость достигается за счет оптического экранирования астаксантином и редукции фотосинтетического аппарата. По-видимому, редукция фотосинтетического аппарата играет ключевую роль для выживания *H. lacustris* при сильном стрессовом воздействии [6]. В отличие от многих микроводорослей, важную роль в клетках *H. lacustris*, играет экранирование, тогда как регулируемое нефотохимическое тушение подавляется. Суть экранирования заключается в том, что астаксантин не связан с фотосинтетическим аппаратом, следовательно, поглощенная им энергия света не передается на реакционные центры, рассеивается в виде тепла. Это позволяет *H. lacustris* какое-то время поддерживать фотосинтетическую активность в условиях стресса и быстро переходить в метаболически активное состояние при возвращении в условия, благоприятные для роста. Способность *H. lacustris* заменять «классические» активные фотозащитные механизмы, такие как регулируемая тепловая диссипация, оптическим экранированием и замедлением метаболизма, делает этот организм интересной моделью для изучения механизмов защиты фотосинтезирующей клетки от неблагоприятных факторов внешней среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда (грант РФФ № 20-74-10028).

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ, ПРОНИЦАЕМОСТИ И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА MITOQ

Шевченко С. А.¹, Назаров П. А.^{2,3}

Биологический факультет МГУ, МФТИ
НИИ ФХБ им Белозерского МГУ

В настоящее время при изучении биологических процессов распространенным методом направленного транспорта лекарственных веществ является адресная доставка малых молекул в интересующий клеточный компартмент. Идея использования проницаемых для мембраны катионов в качестве «локомотивов» для адресной доставки «груза» в митохондрии была предложена еще в 1970 году, однако первое успешное воплощение идеи произошло через 25-30 лет. Одним из первых таких веществ и был митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ, представляющий собой конъюгат убихинона с децил-трифенилфосфониевым катионом.

С начала исследования митохондриально-направленных антиоксидантов SkQ1 и MitoQ считалось, что несмотря на широкий спектр действий на клеточные процессы, антибиотической активностью они не обладают, в том числе при бактериальной инфекции. Однако, в 2017 году в журнале *Scientific Reports* была опубликована статья, показывающая, что SkQ1 обладает высокой антибиотической эффективностью в отношении грамположительных и ряда грамотрицательных бактерий. Поэтому нами была поставлена задача изучить антибактериальные свойства MitoQ и сравнить их с аналогичными свойствами другого митохондриально-направленного антиоксиданта, SkQ1.

Нами было показано, что митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ так же обладает антибактериальным действием и его минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соответствует МИК для SkQ1. При этом, MitoQ более эффективно задерживает выход *Bacillus subtilis* на экспоненциальный рост, при этом влияние на скорость роста *Escherichia coli* было сходно с таковым для SkQ1. При концентрации 1 мкМ наблюдается плавное снижение мембранного потенциала клеток *B. subtilis*, как с SkQ1, так и с MitoQ из-за их протонфорных свойств, а при концентрации 5 мкМ наблюдается резкое снижение потенциала, как в случае SkQ1, так и в случае MitoQ. Как и в случае с SkQ1, MitoQ откачивается из клеток *E. coli* помпой AcrAB-TolC, что свидетельствует, по-видимому, о наличии распознавания помпой структуры C10TPP в составе молекулы MitoQ. По-видимому, пластохинон и убихинон не влияют на распознавание молекул помпой AcrAB-TolC, что позволяет предположить наличие отрицательной селекции на связывание с хинонами, что объяснимо их локализацией во внутренней мембране бактерий. Это предположение подтверждается отсутствием связывания помпы AcrAB-TolC с SkQR1, конъюгатом убихинона с алкилированным родамином 19.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ИНСЕКТИЦИДНЫХ ТОКСИНОВ CRY БАКТЕРИИ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Шиков А. Е.^{1,2*}, Алагов Р. О.^{1,3}, Маловичко Ю. В.^{1,2}, Нижников А. А.^{1,2}, Антонец К. С.^{1,2}

¹Лаборатория протеомики надорганизменных систем, ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет

³Университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

*a.shikov@arriam.ru

Введение. Кристаллические трёхдоменные токсины семейства Cry, продуцируемые бактерией *Bacillus thuringiensis*, представляют собой эффективные и специфические инсектициды. Гипотеза о том, что специфичность токсинов в отношении выбора хозяина обусловлена обменом доменами не была проверена на больших объёмах данных. Кроме того, для

C-терминальных участков показана роль в кристаллизации, однако не известны механизмы, обеспечивающие этот процесс, а также не охарактеризована их доменная структура.

Материалы и методы. Из баз данных IPG (Identical Protein Group), Genbank и *Bt* номенклатуры были выделены трёхдоменные токсины Cry были при помощи разработанного нами инструмента CryProcessor. Выравнивание осуществляли с использованием MAFFT, а построение филогенетических деревьев с помощью ramx1-ng, затем деревья сравнивали топологически. События рекомбинации были выявлены программой RDP, а затем отфильтрованы на основании длины переданного участка и положения родителей и рекомбинантов на дереве. Для выделения консервативных блоков в C и N-терминальных регионах был разработан метод на основе кластеризации k-меров. В выявленных блоках было оценено количество амилоидогенных сайтов при помощи алгоритмов SARP и Waltz.

Результаты и обсуждение. Треть исследуемых токсинов были новыми, многие из них относились к новым классам. Топология дерева третьего домена существенно отличалась от деревьев, основанных на других доменах, свидетельствуя о независимом характере их эволюции. Было выявлено 50 событий рекомбинации, относящихся ко всем трём доменам. Данные были представлены в форме рекомбинационного графа, позволяющего отследить эволюционную историю обменов. Было продемонстрировано значимое ($p < 0.009$) влияние передачи третьего домена на специфичность в отношении выбора хозяина. Было охарактеризовано структурное разнообразие C-терминальных последовательностей на основании длины и количества консервативных блоков. Кроме того, два блока, присущих более половине последовательностей, имели амилоидогенные сайты.

Заключение. Полученные данные позволяют судить о том, что тасовка доменов может служить одним из основных механизмов адаптации токсинов Cry в отношении выбора хозяина, а также о том, что C-терминальный участок может способствовать кристаллизации токсинов за счёт локальной агрегации белков в амилоидогенных сайтах.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 20-76-10044.

СЕКЦИЯ: МИКРОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВКЛЮЧАЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ

БЕЛКИ RopA и RopB КЛУБЕНЬКОВОЙ БАКТЕРИИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* ОБЛАДАЮТ АМИЛОИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Белоусов М. В.^{*1,2}, Косолапова А. О.^{1,2}, Сулацкая А. И.³, Белоусова М. Е.¹,
Сулацкий М. И.³, Антонец К. С.^{1,2}, Волков К. В.², Лыхолай А. Н.², Штарк О. Ю.¹,
Васильева Е. Н.^{1,2}, Жуков В. А.¹, Иванова А. Н.^{2,4}, Зыкин П. А.², Кузнецова И. М.³,
Туроверов К. К.^{3,5}, Тихонович И. А.^{1,2}, Нижников А. А.^{1,2}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, <http://arriam.ru/>

² Санкт-Петербургского государственного университета, <https://spbu.ru/>

³ Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, <https://www.incras.ru/>

⁴ Ботанический институт им. Комарова РАН, Санкт-Петербург, <https://www.binran.ru/>

⁵ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
<https://www.spbstu.ru/>
*belousovmix@gmail.com

Введение и цель работы. Амилоиды – белковые фибриллы, обладающие уникальными физическими и биохимическими свойствами, такими как устойчивость к обработке ионными детергентами, связывание со специфическими красителями. Они играют важные патогенные и функциональные роли и были обнаружены в различных таксономических группах, от прокариот до животных и человека. Большинство функциональных амилоидов бактерий было идентифицировано у видов класса *Gammaproteobacteria*, включая *Escherichia coli* и *Salmonella enteritidis*. Функциональные амилоиды гаммапротеобактерий играют важную роль в формировании биоплёнок, способствуют запасанию токсинов и вызывают гиперчувствительный ответ у растений. Целью работы был анализ на наличие амилоидогенных белков у *Rhizobium leguminosarum*.

Материалы и методы. Мы провели скрининг белков, образующих детергент-устойчивые агрегаты, при помощи метода PSIA-LC-MALDI в протеоме клубеньковой бактерии *R. leguminosarum*, важного для сельского хозяйства вида, относящегося к классу *Alphaproteobacteria*. Далее мы проанализировали амилоидные свойства белков-кандидатов различными молекулярно-генетическими методами: SDS-PAGE, C-DAG, окрашивание Конго красным.

Результаты и обсуждение. Мы идентифицировали 54 белка *R. leguminosarum*, образующих детергент-устойчивые агрегаты. Для дальнейшего анализа мы выбрали белки RopA и RopB, которые принадлежат к семейству белков внешней мембраны, содержащих трансмембранный домен типа «-бочка». Мы показали способность RopA и RopB к образованию детергент-устойчивых агрегатов, имеющих типичную для амилоидов морфологию. Более того, RopA и RopB формируют фибриллы *in vivo* на поверхности клеток *R. leguminosarum*, демонстрирующие свойства, типичные для амилоидов, включая яблочно-зеленое двойное лучепреломление в поляризованном свете при связывании амилоид-специфичного красителя Конго красный.

Выводы. RopA и RopB являются амилоидными белками *R. leguminosarum*.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-16-01100). Исследование проведено с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ и Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФОРМИРОВАНИЯ УСПЕШНОГО АССОЦИАТИВНОГО СИМБИОЗА РИЗОБАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ

Бурыгин Г. Л.^{1,2}, Каргаполова К. Ю.², Ткаченко О. В.²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

В современной агробиотехнологии активно используются ризосферные бактерии в качестве компонентов биоудобрений и средств защиты растений. Понимание механизмов и закономерностей успешного растительно-микробного взаимодействия зачастую отсутствует. Целью данной работы было проведение сравнения эффективности инокуляции растений при культивировании в условиях *in vitro* ризосферными бактериями различных таксономических групп, имеющих существенные отличия по биохимической активности факторов роста-стимуляции, а также изучение влияния на развитие растений бактериальных макромолекул, вовлеченных в формирование растительно-микробного взаимодействия.

Была проведена инокуляция микрорастений картофеля 20 штаммами ризосферных бактерий родов *Azospirillum*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Kocuria* и *Ochrobactrum*, а также обработка эксплантов культуры ткани соматических клеток 7 хроматографически очищенными препаратами липополисахаридов наружных мембран и 3 препаратами флагеллинов полярных жгутиков. Бактериальные культуры были охарактеризованы по способности к азотфиксации, продукции ауксина и фосфатмобилизации. Для трёх штаммов было проведено полногеномное секвенирование с описанием генов и генных кластеров, вовлеченных в растительно-микробные взаимодействия.

Анализ результатов показал, что для эффективной инокуляции растений при культивировании *in vitro* наибольшую значимость имеет способность ризобактерий к продукции ауксина. Активность азотфиксации и фосфатмобилизации бактерий не коррелировала с их рост-стимулирующей активностью, что может быть связано с достаточным присутствием источников азота и фосфора в среде культивирования. Важным показателем для успешного формирования растительно-микробного симбиоза оказался уровень фитоиммунных реакций, вызываемых бактериями и их макромолекулами. В условиях моделированной засухи наиболее эффективной оказалась инокуляция штаммами с генетически детерминированной устойчивостью к стрессу. Следует признать, что использование бактерий, макромолекулы которых вызывают слабые реакции фитоиммунитета, является более рентабельным. Кроме того, инокуляция ризобактериями культуры тканей растений приводила к гибели каллусов, и в данной технологии в качестве регуляторов морфогенеза могут быть использованы только бактериальные липополисахариды.

Работа частично поддержана грантами РФФИ 16-04-01444 и 19-016-0116.

ПОЛУЧЕНИЕ УДОБРЕНИЯ ИЗ ОТХОДОВ: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ КОМПСТИРОВАНИИ АГРО-ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ

Вантеева А. В., Котова И. Б., Миронов В. В., Меркель А. Ю.

ФИЦ Биотехнологии РАН, институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва,
inmi@inmi.ru

Совместное компостирование пищевых отходов и пшеничной соломы является надежной технологией получения органических удобрений. В тоже время, добавление моноsubstrата приводит к увеличению содержания углерода (С) в смеси. Мы предположили, что повышенное содержание С приведет к понижению биоразнообразия микробиоты, но не к уменьшению общей микробной численности и активности разложения. Исследование направлено на установление взаимосвязи между параметрами окружающей среды и микроб-

ным сообществом. Для изучения микробиоты компоста были использованы культуральные методы и профилирование сообщества прокариот и грибов на основе высокопроизводительного секвенирования. Благоприятные условия высокой начальной влажности и содержания С приводили к снижению биоразнообразия микробиоты при существовании таких условий в субстрате. При разогреве основу сообщества составляли молочнокислые бактерии *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, в результате деятельности которых понижался рН и уменьшалась микробная активность. На термофильной стадии общее микробное число увеличилось, активно развивались протеолитические, амилолитические, целлюлозолитические и нитрифицирующие микроорганизмы. Последние способствовали снижению содержания аммония и накоплению нитратов в компосте. Активная минерализация органического вещества осуществлялась представителями родов *Bacillus*, *Caldibacillus*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Грибное сообщество было более чувствительно к резким изменениям температуры, чем прокариотическое. *Byssochlamys* доминировал среди грибов при переходе от мезофильной к термофильной стадии и при остывании. Биоразнообразие увеличивалось со временем и положительно коррелировало с динамикой индексов прорастания и нитрификации. Высокое исходное содержание С не привело к увеличению иммобилизации азота, уменьшению микробной активности и снижению уровня доступных для питания растений веществ. В результате компостирования был получен зрелый компост, отвечающий критериям качества.

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИЦЕЛИАЛЬНЫХ АКТИНО-БАКТЕРИЙ КАК БИОДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Грачёва Т. А.², Бабич Т. Л.¹, Зотова А. Н.²

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Факультет почвоведения МГУ, Москва
tanyadunaeva12@mail.ru

Введение. Для увеличения рентабельности месторождений, находящихся на последней стадии эксплуатации, широкое распространение получили микробиологические методы повышения нефтеотдачи. **Цель.** Изучение актиномицетного комплекса сапропеля, используемого в биотехнологии повышения нефтеизвлечения пластов и определение способности мицелиальных актинобактерий к биодеградации углеводородов нефти. **Материалы и методы.** В работе исследовался образец мелкодисперсного сапропеля, добытый в районе г. Набережные Челны с применением микробиологических, молекулярно-биологических и аналитических методов. **Результаты и обсуждение.** Обнаружено, что в микробном сообществе сапропеля немаловажная роль принадлежит мицелиальным актинобактериям, которые представлены родом *Streptomyces*. Для двух штаммов были определены оптимальные эко-физиологические условия – интервалы роста при различных значениях температуры, солености (NaCl) среды и аэрации. Установлено, что рассматриваемые мицелиальные бактерии способны к биопленочному росту, прикрепляясь к субстрату, они заполняют поры и ниши, что позволит им в подземных пластах не вымываться с водо-нефтяным током. Выявлено, что *Streptomyces albogriseolus* и *Streptomyces chartreusis* способны к биодеградации алифатических углеводородов нефти. В ходе эксперимента по росту стрептомицетов на нефти, были определены важные реологические характеристики культуральной жидкости, такие как поверхностное и межфазное натяжение. Межфазное натяжение, которое показывает, насколько изменяется способность нефти отслаиваться от воды и породы. Экзогенные метаболиты исследованных штаммов образовывали водно-нефтяную эмульсию, что увеличивает подвижность нефти в пласте и способствует её выходу. **Выводы.** Стрептомицеты участвуют в микробиологической трансформации органического вещества нефти с образованием нефтетесняющих соединений, что делает их перспективными агентами как для использования в биотехнологиях повышения нефтеизвлечения пластов, так и при создании биопрепаратов по очистке почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Работа выполнена в рамках темы государственного задания № АААА-А19-119010590007-3.

АНТИМИКРОБНЫЙ МЕТАБОЛИТ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* MX59, КАК ОСНОВА НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ

Гурина Е. В., Васильченко А. С.

Лаборатория антимикробной резистентности,
Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО),
Тюменский государственный университет
gurinalenag@gmail.com

Актуальность

Существует много различных фитопатогенных микроорганизмов, которые являются серьезной проблемой в сельском хозяйстве. Каждый год они снижают качество и количество урожая. Использование химических пестицидов является основной мерой по борьбе с различными фузариозами и бактериозами растений. Но они зачастую являются токсичными для растений, беспозвоночных животных (насекомых-опылителей) и человека. Глиотоксин-продуцирующие организмы, в том числе *Aspergillus fumigatus* MX59, вызывают интерес исследователей как потенциальные агенты для борьбы с различными заболеваниями растений. Поскольку виды глиотоксин-продуцирующих организмов используются в качестве биопестицидов и как усилители роста растений. Они не представляют угрозы для окружающей среды: не загрязняют грунтовые воды и способствуют обогащению почвы.

Цель — получение продуцента биологически активных веществ, перспективного для создания биопестицида.

Материал и методы

В работе использовали штамм *A. fumigatus* MX59, который был выделен из пробы почвы, отобранной в тундре Тазовского района. Фракцию глиотоксина, выделенного из штамма *A. fumigatus* MX59, получали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для установления структурных особенностей был проведен масс-спектр анализ. Оценен спектр антимикробной активности в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов. Проведен анализ времени уничтожения. Фитотоксичность оценивали по влиянию глиотоксина на всхожесть семян, прорастание корней и стеблей.

Результаты

Видовая принадлежность штамма определена по морфологическим признакам и подтверждена геномным анализом по сиквенсу ампликонов 18S рРНК после соответствующей изоляции ДНК. Установлена минимальная ингибирующая концентрация в отношении штаммов: *Staphylococcus aureus* 209P, *S. aureus* MRSA, *Enterococcus faecalis* 581, *Pectobacterium carotovorum* ВКМ В-1247, *Escherichia coli* K12, *Candida albicans*. Обнаружено, что глиотоксин был более эффективен против грамположительных бактерий. Получен профиль кинетики времени уничтожения для *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P. Установлено, что при соинкубировании глиотоксина и семян томата вида *Solanum Lycopersicon*, глиотоксин не оказал фитотоксического эффекта на всхожесть семян, прорастание корней и стеблей. Стоит отметить, что семена были заражены гнилью, но поскольку они замачивались в исследуемых растворах в течение 48 часов, и по истечении времени семена выращивали в чашках Петри, оказалось, что глиотоксин оказал фунгицидное действие.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали, что глиотоксин является перспективным для использования в сельском хозяйстве, поскольку обладает антимикробным действием. В мире известно несколько коммерческих биопрепаратов на основе глиотоксин-продуцирующих микроорганизмов, такие как SoilCard (США), NTS Nutri-Life TrichoShield (Австралия), Gliogard (США).

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПСИХРОФИЛЬНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS* SP., ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕРЗЛЫХ ПОРОД ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И ИХ ПОТЕНЦИАЛ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Доманская О. В., Васильченко А. С. Яшников А. В.

Лаборатория антимикробной резистентности,
Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО),
Тюменский государственный университет
olga-nv@bk.ru

Актуальность. В настоящее время против болезней и вредителей сельскохозяйственных культур в большинстве случаев применяются химические средства защиты растений. Применение фунгицидов в условиях севера является малоэффективным средством, и это связано с тем, что химические реакции идут гораздо медленнее и требуются более высокие дозы, чем на юге. Альтернативой фунгицидам могут служить психрофильные штаммы микроорганизмов с антагонистической активностью в отношении фитопатогенов.

Цель — получить и изучить биотехнологический потенциал штаммов *Bacillus* sp., выделенных из мерзлых отложений Западной Сибири, подавляющие фитопатогенные грибы и стимулирующие рост сельскохозяйственных растений.

Методика. Объектами исследования служили штаммы *Bacillus* sp., выделенные из мерзлых пород Западной Сибири. Антифунгальную активность бактериальных штаммов определяли методом диффузии в агар. В качестве тест-объекта использовали культуры фитопатогенных грибов *Alternaria* sp., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Fusarium graminearum* (Schwabe), *Microdochium nivale* (Fr) Samuels & I.C. Hallet. Общую хитиназную активность определяли при разных температурах культивирования по количеству редуцирующих сахаров. Способность бактерий синтезировать ауксин была изучена по реакции с реактивом Сальковского колориметрическим методом. В лабораторных условиях оценивали эффективность воздействия бактериальных штаммов *Bacillus* sp. на рост и развитие проростков овса сорта Тюменский голозерный. Семена перед посевом инокулировали бактериальной суспензией, полученной при температуре культивирования 5 °С и 22 °С с титром 10⁸–10⁹ кл/мл. Статистическую обработку выполняли с помощью программного средства для анализа данных и визуализации R, версия 3.4.0 при доверительном интервале 95 %.

Результаты и обсуждения. Антифунгальная активность была обнаружена у *B. megaterium* 312 при температуре культивирования 5–28 °С, а у *B. cereus* 875 при 22–45 °С соответственно. Максимальная хитиназная активность отмечена при 5 °С у штамма *B. cereus* 875 (1,62 мкг/мл час), при 22 °С у *B. simplex* 948P-1 (1,13 мкг/мл час) и у *B. megaterium* 206 (0,73 мкг/мл час) при 4 °С. У всех 10 исследуемых штаммов, была отмечена ауксинпродуцирующая способность. Наиболее активным продуцентом ауксина при трех температурах культивирования оказался штамм *B. simplex* 948P1 (13,5–95,2 мкг/мл). Проведенные лабораторные эксперименты по влиянию бактериализации семян *Avena sativa* L., показали положительное влияние *B. cereus* 875 и *B. simplex* 948P-1, что нашло отражение в достоверном увеличении длины побега и корней по сравнению с контролем.

Заключение. Таким образом, выделены и изучены психрофильные штаммы *Bacillus* sp., обладающие антифунгальной и ростостимулирующей активностью растений в условиях низких температур. Сформированная коллекция продуцентов станет основой для создания серии биопестицидов для использования в растениеводстве в экстремальных почвенно-климатических условиях Западной Сибири.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS*, НЕСУЩИХ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ ГЕНЫ СТЕРОИДНЫХ МОНООКСИГЕНАЗ

Карпов М. В.¹, Николаева В. М.¹, Фокина В. В.¹, Шутов А. А.¹,
Казанцев А. В.², Стрижов Н. И.¹, Донова М. В.¹

¹ ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, mikhail.v.karpov@mail.ru, +79295526722

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

Биологическая активность стероидов во многом зависит от присутствия в их структуре кислородных функций. Наличие 15 β -гидроксильной группы характерно для стероидов эмбрионов, важно для развития плода, а также связано с антиандрогенной активностью. Актуальной задачей остается разработка одностадийного биотехнологического получения ценных гидроксистероидов. Гидроксילирование стероидов наиболее эффективно осуществляют монооксигеназы суперсемейства цитохромов P450 (CYP).

Целью настоящего исследования являлось создание и изучение активности рекомбинантных штаммов *M. smegmatis*, экспрессирующих гены цитохромов CYP106A1 из *Bacillus megaterium* DSM319 и CYP106A2 из *B. megaterium* ATCC13368.

Штамм *Mycolicibacterium smegmatis* mc²155 генетически модифицирован для использования в качестве экспрессионной платформы путем внесения делеций в гены *kshB* и *kstD*, кодирующие ферменты деструкции стероидного ядра. Сконструированы плазмидные генетические конструкции, позволяющие экспрессировать гены CYP106A1 и CYP106A2 в клетках *M. smegmatis* ($\Delta kshB$, $\Delta kstD$) одиночно, либо совместно с суррогатными системами транспорта электронов. Полученные с их использованием рекомбинантные штаммы миколицибактерий в ростовых условиях осуществляли селективное моногидроксילирование андростендиона (АД) в положении С15(β), что подтверждено методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. Максимальный уровень продукции 15 β -гидрокси-АД ($17,3 \pm 1,5$ мг/л) выявлен в культуре рекомбинантного штамма *M. smegmatis* ($\Delta kshB$, $\Delta kstD$), экспрессирующего одиночный ген CYP106A2 из *B. megaterium* ATCC13368.

Показано, что нативные белки *M. smegmatis* способны снабжать электронами гетерологичные цитохромы P450 для проявления их активности. Результаты расширяют представления о гидроксילировании стероидных соединений бактериальными цитохромами CYP106A1/A2 и важны для создания микробных штаммов-продуцентов ценных гидроксистероидов.

Исследование поддержано Российским Научным Фондом (проект РНФ №21-64-00024).

БИОФИЗИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДГЕЗИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ

Криворучко А. В., Куюкина М. С., Ившина И. Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь nast@iegpm.ru

Напряженная экологическая ситуация обуславливает необходимость расширения и интенсификации исследований особенностей микроорганизмов загрязненных сред, так называемых стресс-толерантов, играющих роль первичной системы реагирования на неблагоприятные или потенциально опасные изменения среды и иницирующие адаптивные реакции на самых ранних стадиях. Цель настоящей работы – исследование механизмов адгезии углеводородокисляющих актиномицетов рода *Rhodococcus* (класс *Actinomycetia*) и оценка роли адгезии в формировании общей приспособляемости данной группы микроорганизмов к выживанию в условиях антропогенно загрязненных экосистем.

С использованием массива свежевыделенных и коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmcoll.ru>) и комплекса микробиологических, физико-химических, биохимических, молекулярно-биологических и микроскопических методов исследования, включая атомно-силовую, конфокальную лазерную сканирующую и интерференционную микроскопии, обосновано, что адгезия является одним из основных механизмов, обеспечивающих биodeградацию углеводов, и универсальной адаптивной реакцией родококков в ответ на повреждающее воздействие углеводов. Показано, что гликолипидные биосурфактанты, продуцируемые родококками в ответ на присутствие в среде жидких углеводов, выполняют функцию адгезивных молекул, установлена их важная роль в адгезии родококков. Выявлена прямая зависимость адгезивной активности родококков от степени шероховатости (особенности микрорельефа поверхности) клеток. Показана локализация адгезинов липидной природы в специфических придаточных структурах, обнаруживаемых на поверхности клеток, и их определяющая роль в адгезии *Rhodococcus*. С помощью метода высокочувствительной инфракрасной термографии исследована термодинамика адгезии родококков, обнаружен выраженный экзотермический эффект данного процесса и разработан простой, бесконтактный, экспрессный метод количественной оценки бактериальной адгезии. Получена серия работающих прототипов биокатализаторов на основе прикрепленных родококков, сохраняющих активность в течение 8 мес и пригодных для использования в процессах биodeградации углеводов и их производных.

Исследования выполнены в рамках госзаданий АААА-А19-119112290008-4, ААА-А-А19-119112290010-7, АААА-А19-119031890083-9 и при поддержке грантов РФФ 21-14-00132 и РФФИ 20-44-596001.

БИОДЕКОЛОРИЗАЦИЯ МАЛАХИТОВОГО ЗЕЛЕНОГО СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ АЗОСПИРИЛЛ

Купряшина М. А., Пылаев Т. Е., Пономарева Е. Г.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
kupryashina_m@mail.ru

Для решения проблем восстановления экологического равновесия и очистки окружающей среды все более активно используются биологические методы, которые в большинстве случаев являются экономически обоснованной альтернативой химическим и физико-химическим методам. Зачастую химические методы очистки предполагают применение агрессивных реагентов, в связи с этим приоритет отдается технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов, позволяющим избежать вторичного загрязнения. Биопрепараты с иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами осуществляют эффективную биodeградацию как неорганических веществ, так и многих органолюбителей. Иммобилизация клеток обеспечивает возможность создания биотехнологических процессов с высоким выходом целевых продуктов и возможностью повторного использования, при этом их техническое решение существенно упрощено по сравнению с процессами на основе свободных клеток. Использование иммобилизованных клеток для очистки окружающей среды, а также в различных технологических процессах не потеряло актуальность в настоящее время, что находит отражение в активном исследовании новых методов, матриц и объектов. Целью данной работы явилось получение иммобилизованных бактерий рода *Azospirillum*, анализ их метаболической активности и исследование эффективности деколоризации малахитового зеленого свободными и иммобилизованными клетками.

С использованием приемов, основанных на физическом и химическом связывании, проведены исследования по иммобилизации клеток бактерий рода *Azospirillum* на различных носителях. Качественное наличие жизнеспособных иммобилизованных клеток азоспирилл подтверждали высевом полученных образцов на плотную среду, а также с применением резазурин-теста с незначительными модификациями. Исследования поверхностной

морфологии носителя, и иммобилизованных бактерий осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии. Показана перспективность использования вермикулита в качестве матрицы для иммобилизации бактерий *A. brasilense*. Благодаря комплексному подходу с применением современных методов анализа впервые получены уникальные сведения о биодеколоризации малахитового зеленого свободными и иммобилизованными клетками азоспирилл. Анализ спектров экстинкции, данных тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ и ИК-спектроскопии образцов малахитового зеленого до и после биодеколоризации, свидетельствует о деструкции молекулы красителя с образованием метаболитов, не схожих по структуре с лейкомалахитовой формой. Проведен анализ метаболической эффективности иммобилизации азоспирилл, а именно исследован уровень фенолоксидазной активности иммобилизованных клеток в сравнении с суспензионными. Проведение 10 повторных циклов обесцвечивания показало возможность повторного использования иммобилизованных на вермикулите азоспирилл для биодеколоризации. Эффективность обесцвечивания сохранялась на уровне 60 % после 6 циклов использования. Проведенные исследования перспективны для создания систем, объединяющих сорбенты и микроорганизмы, способных к окислению токсичных поллютантов.

МИКОБИОТА КОКОНОВ И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *EISENIA FETIDA, DENDROBAENA VENETA*

Кураков А. В., Биланенко Е. Н., Бондаренко С. А., Попова О. В., Тихонов В. В.

МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический ф-т, Москва, info@mail.bio.msu.ru

Грибы и дождевые черви являются важнейшими компонентами биоты наземных экосистем. Между ними существуют трофические, форические и метаболические взаимодействия, многие аспекты которых изучены. Загадочными остаются вопросы существования видов грибов, тесно ассоциированных с червями и специфики микобиоты их пищеварительного тракта.

Цель работы - исследование состава грибов внутри коконов и пищеварительной системы дождевых червей *Eisenia fetida*, *Dendrobaena veneta*.

Изучали простерилизованные с поверхности коконы и освобожденные от содержимого пищеварительные тракты *E. fetida* и *D. veneta*, содержащиеся в коровьем навозе с соломой. Состав грибов определяли методами посевов на среды с идентификацией по морфолого-культуральным и молекулярно-генетическим признакам (ITS рДНК) и с помощью метагеномного анализа. ДНК из образцов экстрагировали стандартным набором DNeasy PowerSoil Kit. Проведено высокопроизводительное NGS секвенирование ITS1, ITS2 рДНК грибов и биоинформатическая обработка данных.

Из внутреннего содержимого коконов был выделен только *Byssochlamys nivea* (Eurotiales, Ascomycota), не встреченный в субстрате и пищеварительной системе. При метагеномном анализе из коконов он не выявлен, обнаружены преимущественно неидентифицированные виды из Nurocreales, Ascomycota (72–88 %). Разнообразие аско- и базидиомицетов коконов *E. fetida* и *D. veneta* 14 и 24 вида.

В пищеварительном тракте обоих червей выявлены виды отделов Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota, Chytridiomycota (67–152 таксона Fungi, 11 Oomycota). 66 видов у *E. fetida* и 15 у *D. veneta* установлено на основе метагеномного анализа. Общим для них с долей ОТЕ 0.8-3.0% был аскомицет *Alternaria iridialustralis*. Среди культивируемых грибов в кишечниках червей доминируют *Fusarium oxysporum*, *Mucor circinelloides*, аско- и базидиомицетные дрожжи, некоторые другие, которые отмечены и в компостируемом навозе. При питании они попадают в пищеварительный тракт и становятся его обитателями. Для ряда из них характерен мицелиально-дрожжевой диморфизм.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-25073мк.

ГЕНОМНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИЙ *CURTObACTERIUM*

Лукьянова А. А.^{1,2}, Токмакова А. М.¹, Евсеев П. В.¹, Игнатов А. Н.³, Мирошников К. А.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, a.al.lukianova@gmail.com

² МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

³ Российский университет дружбы народов, Москва

Ряд видов и патоваров грамположительных бактерий рода *Curtobacterium* фитопатогенны по отношению к экономически важным сельскохозяйственным культурам. В частности, *S. flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* является карантинным патогеном бобовых во многих странах мира. Появление большого количества новых геномных данных, в том числе о предположительно новых таксонах, ставит вопросы о таксономической классификации новых представителей *Curtobacterium*. Анализ новых данных также показывает неприменимость ранее разработанных методов ПЦР-диагностики *Curtobacterium*.

Материалы и методы

Использовались геномные последовательности около 170 штаммов, депонированных в базе данных Genbank, классифицированных как представители *Curtobacterium*. Биоинформатический анализ проводился сравнением общегеномного сходства, филогенией по консервативным генам, включая гены 16S рРНК, 23S рРНК и конкатенированные последовательности генов домашнего хозяйства. С помощью алгоритма определения уникальных последовательностей генома были сконструированы родо- и видоспецифические праймеры для дифференциальной диагностики *Curtobacterium*. Праймеры были проверены на 22 штаммах ВКМ и 50 полевых изолятах.

Результаты и обсуждение

По результатам анализа геномных данных сделаны предположения по совершенствованию таксономической классификации. Были обнаружены ошибочно классифицированные организмы, а также представители потенциально новых таксономических групп, включая новые геномовиды *Curtobacterium* и новый род семейства Microbacteriaceae. Были предложены и проверены новые способы ПЦР-диагностики *Curtobacterium*, получены и обработаны данных секвенирования маркерных последовательностей, классифицированы представители новых таксонов.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-16-00047.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ТОКСИЧНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ФОСФОРА

Миндубаев А. З.¹, Бабынин Э. В.², Бадеева Е. К.³, Акосах Й. А.²

¹ Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³ Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань
mindubaev-az@yandex.ru

Элемент фосфор представляет собой сильнейший яд в виде восстановленных соединений и ряда эфиров фосфорной кислоты. Но в полностью окисленном состоянии (неорганические фосфаты) он является биогенным элементом, необходимым для всех форм жизни [1]. С учетом этого, велики перспективы биодеградации токсичных соединений фосфора, в том числе элементного фосфора. Мы реализуем их в своей работе.

Нами выделены и изучены культуры микроорганизмов, превращающие ряд токсичных соединений фосфора в фосфат, безвредный для окружающей среды. Предлагаемый нами

метод [2–5] позволит производить очистку сточных вод предприятий и загрязненных территорий. Нам удалось подвергнуть биологической деструкции токсичные неорганические вещества – белый и красный фосфор (рис. 2), ряд солей кислот восстановленного фосфора. Биодеградацию элементного фосфора мы наблюдали впервые в мире.

ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩЕЕ МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ЛАБОРАТОРНОГО РЕАКТОРА ТИПА SBR

*Пелевина А. В., Берестовская Ю. Ю., Грачёв В. А., Дорофеева И. К., Сорокин В. В.,
Дорофеев А. Г., Каллистова А. Ю., Николаев Ю. А., Груздев Е. В., Белецкий А. В.,
Равин Н. В., Пименов Н. В., Марданов А. В.*

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Фосфор – один из биогенных элементов, который вызывает эвтрофикацию водоёмов, попадая в них, главным образом, со сточными водами. Поэтому очистке сточных вод от фосфора уделяется большое внимание.

Одним из наиболее перспективных методов удаления этого биогена является его биологическое удаление. Этот процесс осуществляют фосфат-аккумулярующие микроорганизмы (ФАО) – физиологическая группа микроорганизмов, которая развивается в активном или очистных сооружениях в условиях периодической смены аэробных/анаэробных фаз и способна к внутриклеточному накоплению полифосфатов. Несмотря на полувековой опыт использования ФАО на очистных сооружениях, до сих пор основные представители этой физиологической группы не были выделены в чистые культуры.

Целью исследования было получение и изучение фосфат-аккумулярующего микробного сообщества, развивающегося в лабораторном биореакторе типа SBR. В условиях циклического чередования аэробной и анаэробной фаз в биореакторе (с частотой цикла 6 часов) было получено устойчивое, обогащенное ФАО микробное сообщество, которое эффективно удаляло фосфор. В анаэробной фазе каждого цикла наблюдалось полное потребление подаваемого в биореактор субстрата (ацетата) с одновременным выбросом из клеток фосфатов. В аэробной фазе происходило резкое снижение количества фосфатов, которое соответствовало 61 % удаления фосфора из поступающей среды.

Микробное сообщество в реакторе развивалось с формированием 2-х морфологически различных типов флоккул. I тип флоккул представлял собой однородные плоские округлые образования белого цвета с ровными краями, размеры которых варьировали от 0,1 мм до 0,7 мм. II тип флоккул был представлен структурами неправильной формы размером 0,1–0,5 мм с неровными краями коричнево-серого цвета. Результаты молекулярно-биологических и электронно-микроскопических исследований флоккул показали, что во флоккулах первого типа доминировали ФАО: «Ok. Accumulibacter phosphatis» и представители рода Dechloromonas доля составляла не менее 41,5 %, во флоккулах второго типа доминировали бактерии гликоген-аккумулярующие микроорганизмы семейства Competibacteraceae (28 %).

Таким образом, в ходе работы лабораторного реактора SBR типа по удалению фосфора из сточных вод, в нем сформировалось устойчивое микробное сообщество, в котором содержатся два типа флоккул с различным видовым составом.

Работа финансировалась из средств гранта РФФИ № 21-64-00019.

БИООБРАСТАНИЕ АНАММОКС-БАКТЕРИЯМИ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПОДЗЕМНОГО ПРОНИЦАЕМОГО БАРЬЕРА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АЗОТНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Попова Н. М.¹ *, Сафонов А. В.¹, Артемьев Г. Д.¹, Вишнякова А. В.², Литти Ю. В.²

¹Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва,
*no.hope996@gmail.com

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, Москва

Загрязнение подземных вод нитратами, нитритами и аммонием может происходить в результате деятельности агротехнических и промышленных предприятий. Наиболее экстремальное комплексное азотное загрязнение происходит вследствие фильтрации растворов из хранилищ химических и радиоактивных отходов, содержащих не только азот, но и тяжелые металлы и радионуклиды. Препятствием распространению загрязнений в подземных водах могут служить проницаемые барьерные системы, в основе которых используются различные материалы, цеолиты, керамзит, песок, глины и т.д., способствующие иммобилизации металлов, при этом бактерии, образующие биопленки на этих материалах, используются для удаления разных форм азота. Наиболее эффективной для удаления азотных загрязнений является группа анаммокс-бактерий, осуществляющих процесс анаэробного окисления аммония нитритом [1]. Поскольку анаммокс бактерии имеют тенденцию к прикрепленному росту и образованию биопленок, эффективность биообращения минерального субстрата для очистки является ключевой.

Проведена оценка таксономического разнообразия проб пластовой воды, отобранной в районе шламохранилища ЧМЗ с высоким уровнем загрязнения по аммоний и нитрату (до 215 мг/л NH_4^+ и 4300 мг/л NO_3^-). В пробе обнаружены анаммокс бактерии родов *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*.

Проведена оценка возможности развития анаммокс бактерий на наиболее распространенных минеральных компонентах барьеров (каолиновая и бентонитовая глина различного состава и происхождения, песок с разным содержанием глинистой фракции, керамзит, вермикулит, цеолит и цеолитсодержащий трепел) на примере сообщества с преобладанием анаммокс-бактерии *Candidatus Jettenia Ecosi*, культивированного в анаммокс-реакторе. В лабораторном эксперименте был смоделирован состав подземных вод (содержание аммонийного азота (50 мг/л) и нитритного (60 мг/л) в молярном соотношении составляло 1:1,2) [2].

Обнаружена способность анаммокс-сообщества максимально эффективно образовывать биопленки на каолиновой глине, керамзите и цеолите (рис. 1). Так, площадь биопленки на материале составляла от 8 % (песок) до 48 % (цеолит). Максимальная скорость потребления азотных субстратов составляла 3,4 ммоль N/г ОВ/час для роста на каолиновых глинах канатского и камалинского месторождений, и 2,6 ммоль N/г ОВ/час на керамзите.

Отмечено, что на биообращение материала влияет не только удельная площадь поверхности, но и его минеральный и элементный состав, в первую очередь наличие биофильных элементов. Установлено, что доминирующим фактором развития биопленок анаммокс бактерий на глинах является морфологические особенности; так, на сильно набухающем бентоните, несмотря на большую доступность элементов обменного комплекса (K, Na, Fe и др.), вследствие его слабой структурированности, эффективность развития биопленок уступает каолиновым глинам, содержащим меньше свободных катионов, но при этом мало набухающим и менее аморфным.

Полученные результаты будут использованы при создании *in situ* проницаемого биогеохимического барьера в условиях водоносного горизонта в районе ОАО «ЧМЗ».

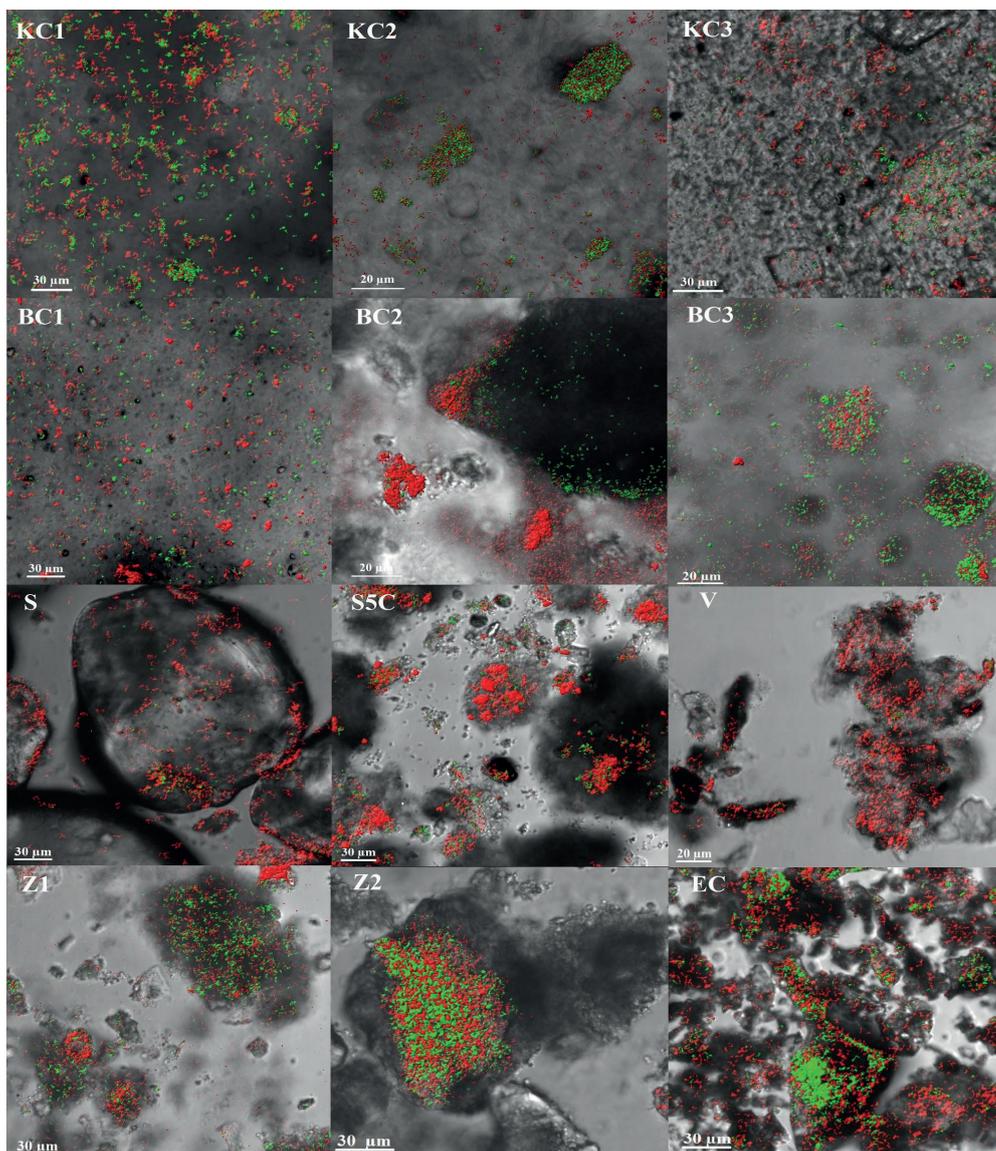


Рисунок 1. Конфокальные микрофотографии биопленок анаэробных бактерий на различных минеральных носителях (красители: нуклеиновые кислоты - SYTO-11 green, полисахариды - WGA)

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТОВ С КОМПЛЕКСНЫМ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ ВБЛИЗИ УРАНОВЫХ ШЛАМОХРАНИЛИЩ И ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА СООБЩЕСТВ ПРИ БИОРЕМЕДИАЦИИ

Сафонов А. В.¹, Попова Н. М.¹, Артемьев Г. Д.¹ Богуславский А. Е.²

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва

^бИнститут геологии и минералогии им. В. С. Соболева СО РАН,

Новосибирск

alexeyasafonof@gmail.com

Хранение отходов предприятий, занимающихся переработкой урановой руды и обогащением урана в бассейнах-шламохранилищах приводит к экстремальному комплексному загрязнению приповерхностных водоносных горизонтов нитратами, аммонием, сульфатами тяжелыми металлами и ураном. В данной работе проведена оценка микробного разнообразия пластовых вод, отобранных вблизи шламохранилищ трех предприятий Новосибирско-

го завода химических концентратов (НЗХК), Ангарского электролизно-химического завода (АЭХК) и Электрохимического завода в городе Зеленогорск Красноярского края (ЭХЗ). Пробы, отобранные вблизи данных предприятий, имели разнообразный уровень загрязнения. В пробах из НЗХК общее солесодержание не превышало 7 г/л, и было обусловлено нитрат и сульфат-ионами, в пробах АЭХК наблюдалось значительное загрязнение ионами аммония (до 400 мг/л), в пробах из ЭХЗ содержание нитрат-ионов достигало 15 г/л, ионов аммония до 200 мг.

Профилирование микробного сообщества отобранных проб по генам 16S рРНК показало значительное доминирование в загрязненных пробах АЭХК и ЭХЗ представителей родов *Desulfovibrio* и *Nocardia*, в пробах НЗХК доминировали представители родов *Sulfurimonas* *Gallionella* и группы *Parcubacteria*. Важно отметить, что в пробах обнаружены представители планктомицет, способных осуществлять процесс анаммокс. Оценка индексов разнообразия сообществ для отобранных проб с различным уровнем загрязнения позволила определить, что максимальное разнообразие наблюдалось во всех случаях в незагрязненной пробе, в пробе со средним уровнем загрязнения оно было минимальным, а в самых грязных пробах, индексы Чао и Шеннона имели средние значения. Исключение составляла проба из ЭХЗ с содержанием нитрата более 12 г/л. В лабораторных условиях проведен подбор добавок различных органических субстратов для стимулирования сообщества загрязненной пробы ЭХЗ. Проведена оценка микробного разнообразия микрокосмов после стимулирования органическими субстратами. Установлено, что максимальная скорость удаления нитрата наблюдалась при добавлении сахара, ацетата, молочной сыворотки и мелассы. В результате *in situ* эксперимента при добавлении в водоносный горизонт молочной сыворотки наблюдали трехкратное снижение концентрации нитрат ионов при исходной концентрации около 6 г/л и значительное изменение состава микробного сообщества, состоящего как из привнесённых, так и автохтонных микроорганизмов. Наблюдалось доминирование органотрофных бактерий способных к денитрификации родов *Acidithiobacillus*, *Thiomonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*. После стимулирования количество выделенных таксонов резко снизилось за счет редких и малочисленных групп. При проведении мониторинга состава микробного сообщества с течением времени происходило выделение нескольких доминантных групп.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-05-00602 А.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РИЗОБИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕЛИКТОВЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА У ТРАДИЦИОННЫХ БОБОВЫХ КУЛЬТУР

Сафронова В.,¹ Сазанова А.,¹ Кузнецова И.,¹ Белимов А.,¹ Гуро П.,¹ Карлов Д.,¹ Юзихин О.,¹ Чирак Е.,¹ Верхозина А.,² Афонин А.,¹ Андронов Е.,^{1,3} Тихонович И.^{1,3}

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

³Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург

Изучена перспектива использования феномена ризобиальной синергии для повышения эффективности азотфиксирующего симбиоза у люцерны (*Medicago varia* Martyn), вики обыкновенной (*Vicia sativa* L.) и клевера красного (*Trifolium pratense* L.). Растения были инокулированы соответствующими коммерческими штаммами *Sinorhizobium meliloti* RCAM1750, *Rhizobium leguminosarum* RCAM0626 или *R. leguminosarum* RCAM1365, а также штаммами *Mesorhizobium japonicum* Opo-235, *M. japonicum* Opo-242, *Bradyrhizobium* sp. Opo-243 или *M. kowhainii* Ach-343, выделенными из реликтовых бобовых растений *Oxytropis popoviana* Peschkova и *Astragalus chorinensis* Bunge. С помощью анализа полногеномных последовательностей было показано, что упомянутые выше изоляты дополняют коммерческие штаммы некоторыми симбиотическими генами (*fix*, *nif*, *nod*, *noe* и *nol*), а также генами, способству-

ющими росту растений и формированию симбиоза (*acdRS*; гены, связанные с системами секретиции T3SS, T4SS и T6SS, а также с биосинтезом гиббереллинов и ауксинов).

Результаты микровегетационных опытов с использованием вариантов моно- и совместной инокуляции показали, что во многих случаях взаимодействие между коммерческими штаммами и изолятами выражалось в повышении симбиотических параметров, таких как количество клубеньков, биомасса растений или ацетилен-редуктазная активность. Мы предполагаем, что дальнейшее исследование микробной синергии с использованием ризобий реликтовых бобовых растений позволит провести целенаправленную селекцию ко-микросимбионтов для повышения эффективности растительно-микробных взаимоотношений у традиционных бобовых культур.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В НЕФТЯНОМ МЕСТОРОЖДЕНИИ УЗЕНЬ (КАЗАХСТАН) КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕИЗВЛЕЧЕНИЯ

Соколова Д. Ш.^{1*}, Семёнова Е. М.¹, Бабич Т. Л.¹, Груздев Д. С.¹, Биджиева С. Х.¹,
Ершов А. П.¹, Жапаров Н. С.², Назина Т. Н.¹

¹ Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

² Филиал ТОО «КМГ Инжиниринг» «КазНИПИМунайгаз», Актау, Казахстан

* sokolovadiyana@gmail.com

Существующие методы позволяют извлекать около половины геологических запасов нефти в пласте. Микробиологические методы увеличения нефтеизвлечения все чаще применяются на выработанных нефтяных пластах. Целью настоящей работы было определение функционального и филогенетического разнообразия микроорганизмов нефтяного месторождения Узень (Казахстан) для разработки микробиологического метода интенсификации добычи нефти. В ходе работы были определены физико-химические условия, микробное разнообразие пластовых вод и биотехнологический потенциал пластового микробного сообщества.

Нефтяные пласты месторождения Узень имеют высокую температуру (57–68 °С), которая снижалась до 40–45 °С в призабойной зоне нагнетательных скважин. Пластовая вода хлоркальциевого типа характеризовалась высокой общей соленостью, высоким содержанием сульфатов и сульфида.

Основными компонентами термофильного микробного сообщества нефтяного пласта были бродильные бактерии, численность которых в пластовой воде из добывающих скважин достигала 10⁷ кл/мл. Термофильные аэробные органотрофные бактерии не были обнаружены в пробах воды из добывающих скважин. Методом анализа V3–V4 фрагментов гена 16S рРНК в 20 пробах пластовой воды показано высокое содержание метаногенных архей рода *Methanothermococcus* (4,3–82,1 % от количества последовательностей в библиотеках). В нефтяных пластах преобладали термофильные сульфатредуцирующие бактерии родов *Desulfonauticus* и *Thermodesulfobacterium*. Из пластовой воды выделены аэробные бактерии, образующие биоПАВ, и бродильные бактерии, образующие значительные количества летучих кислот и спиртов из неуглеводородных субстратов. Жизнедеятельность микробного сообщества призабойной зоны нагнетательных скважин может быть активирована внесением окислителей и минеральных солей азота и фосфора с целью образования нефтевытесняющих соединений в нефтяном пласте. Необходимо проведение модельных экспериментов с использованием выделенных микроорганизмов и кернов нефтесодержащих пород для выбора подходящей микробной технологии повышения извлечения нефти из нефтяных пластов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 21-64-00019).

ИЗБЫТОЧНОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ ФОСФОРА КЛЕТКАМИ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

*Соловченко А. Е., Горелова О. А., Селях И. О., Баулина О. И., Семенова Л. Р.,
Щербаков П. Н., Зайцев П. А., Лукьянов А. А., Лобакова Е. С.*

Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва
solovchenko@mail.bio.msu.ru

Считается, что многие виды микроводорослей эволюционировали в условиях низкой и непостоянной доступности фосфора (Р). Адаптации к дефициту Р включают перестройки липидного метаболизма, снижение фотосинтетической активности и активацию механизмов избыточного поглощения Р. Избыточное поглощение (luxury uptake) Р – поглощение данного нутриента в большем количестве, чем требуется для очередного деления клетки. Все вышеперечисленные механизмы важны для биотехнологии микроводорослей. Так, голодание по фосфору вызывает накопление ценных каротиноидов и липидов в клетках микроводорослей, в то время как избыточное поглощение Р и азота – ключевые механизмы изъятия этих элементов из сточных вод и иных бросовых ресурсов. При этом генерируется биомасса, пригодная для использования в качестве биоудобрений, безопасных для окружающей среды.

Механизмы приспособления микроводорослей к фосфорному голоданию изучены недостаточно. Так, фосфорное голодание меньше замедляет рост культуры, чем азотное голодание вследствие наличия обильных внутриклеточных резервов Р в виде неорганических полифосфатов, образующихся в периоды интенсивного поглощения Р. При этом высокие концентрации экзогенного Р могут быть токсичными. Они могут ингибировать деление клеток микроводорослей и даже вызывать их гибель, что потенциально может быть проблемой при биологической доочистке сточных вод культурами микроводорослей. По всей видимости, токсический эффект Р возникает, когда скорость поглощения Р значительно превышает скорость его превращения в длинноцепочечные полифосфаты и транспортировки последних в клеточную вакуоль. Вероятно, токсичность Р опосредована образованием множества короткоцепочечных полифосфатов, нарушающих сворачивание белковых молекул и вызывающих иные нарушения функций клеток. Особенно часто это наблюдается при добавлении высоких концентраций Р к клеткам, голодавшим по фосфору.

Понимание взаимосвязи между доступностью Р, жизнеспособностью клеток и их способностью к избыточному поглощению этого элемента важно для разработки эффективных биотехнологий для производства ценных метаболитов и защиты окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФ 20-64-46018 (мониторинг жизнеспособности культур) и 21-74-20004 (анализ токсических эффектов).

БАКТОГУМУСОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ КАК ОСНОВА ПРИРОДОПОДОБНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ

Степанов А. Л., Козлова Е. А., Лысак Л. В.

МГУ им. М. В. Ломоносова, факультет почвоведения, кафедра биологии почв, Москва

Гуминовые кислоты – неотъемлемая составляющая почв, во многом определяющая её устойчивость к загрязнению распространёнными экотоксикантами и способность к самоочищению. Существенное влияние на процессы формирования, состав и свойства гуминовых кислот оказывают микробные сообщества почв. Изучение взаимодействия гуминовых кислот и микроорганизмов представляет практический интерес, поскольку полученные данные можно использовать для создания бактериальных препаратов на основе гуминовых кислот, применение которых перспективно в целях ремедиации почв и других объектов окружающей среды от экотоксикантов.

Целью работы было исследование возможности сорбции гуминовых кислот на микробных клетках и создание бактогумусовых препаратов нового поколения для повышения устой-

чивости и активности целевых микробных популяций в объектах окружающей среды (почвах, грунтах, подземных водах). Работа проводилась с 5 % раствором гумата калия и чистыми культурами бактерий родов *Rhodococcus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Erwinia*, а также нативным микробным комплексом, выделенным из перегнойно-глеевой почвы (Чашниково, Моск. обл.). Эксперименты по детоксикации почв от нефтепродуктов и тяжёлых металлов проводились с дерново-подзолистой почвой. В качестве загрязнителя вносились нефть, дизельное топливо в концентрациях 2, 4% и водорастворимых солей металлов (сульфата меди и ацетата свинца) в пятикратном превышении их предельно-допустимой концентрации. В качестве тест-культуры высаживались растения кресс-салата.

В результате исследований, разработана технология сорбции ГК на микробных клетках, подтвержденная методом электронной микроскопии. Обнаружено положительное действие бактогумусовых препаратов, превышающее эффект от инокуляции чистых культур бактериальных суспензий на 50–90 %. Установлено, что исследованные бактерии способны поддерживать численность в составе препарата на основе гуминовых кислот не более 1 года. Обнаружена способность сохранения в течение длительного периода времени целевых популяций бактерий в объектах окружающей среды, в случае их внесения в составе бактогумусовых препаратов. Применение бактогумусовых препаратов позволило эффективно провести ремедиацию почв, загрязнённых нефтью, нефтепродуктами и тяжёлыми металлами в течение одного вегетационного периода, что выражалось в увеличении биомассы выращенных растений, повышении биологической активности почвы и снижении концентрации поллютантов за счет микробной деструкции (в случае с углеводородами) и снижению токсичности тяжёлых металлов за счет уменьшения их подвижности и биодоступности в почве в результате связывания с гуминовыми кислотами. Полученные данные служат основой создания и применения бактогумусовых препаратов, представляющих собой устойчивый комплекс гуминовых кислот и микроорганизмов, длительное время сохраняющих свои свойства в условиях хранения, внесения в почву и высокоэффективных в целях ремедиации почв, загрязнённых тяжёлыми металлами и нефтепродуктами.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ В СОЗДАНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Стойнова Н., Машко С., Крылов А., Лобанова Ю., Горшкова Н., Игонина О., Малых Е., Сычева Е., Ублинская А., Гук К., Самсонов В.

АО НИИ Аджиномото-Генетика (АГРИ), Москва

Метаболическая инженерия бактерий, направленная на изменение ферментативных реакций и транспортных систем для получения промышленно значимых целевых соединений включает ряд общих подходов, основанных на фундаментальных знаниях о функционировании клеток. При этом особое внимание уделяется инструментам геномного редактирования, а также созданию с их помощью искусственных экспрессионных единиц, в том числе, автоиндуцибельных и иных метаболически регулируемых систем. Наиболее востребованными в их числе являются экспрессионные системы, разработанные на основе рекомбинационных систем бактериофагов и адаптированные нами для нескольких широко используемых в биотехнологии бактерий — *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* и *Methylophilis methylotrophus*. Для приведенных микроорганизмов описываются разнообразные методы получения множественных, направленных и рандомных, безмаркерных хромосомных модификаций: Dual In-Out подходы, Му-интеграция, ПЦР-free направленная интеграция протяженных фрагментов ДНК с использованием *in vivo* клонирования и т. д. Таким образом, в настоящей работе представлен обзор наиболее надежных методов, используемых в нашем институте для быстрого и эффективного конструирования промышленных штаммов — продуцентов биологически активных соединений: аминокислот и их производных.

ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ИНТРОДУЦЕНТОВ НА РАСТЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ

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

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов
institute@ibppm.ru

Роль растений в процессах фиторемедиации является ведущей. Однако обогащение их ризосферы штаммами микроорганизмов с полезными свойствами могут существенно повысить эффективность очистки. Формирование искусственных растительно-микробных ассоциаций, межорганизменные взаимодействия внутри них представляют значительный научный и практический интерес, поскольку именно они определяют эффективность фиторемедиации.

Цель представленной работы – изучение искусственной растительно-микробной ассоциации в процессе фиторемедиации нефтезагрязненной почвы в условиях засухи.

Для формирования ассоциации использовали растения сорго веничное (*Sorghum bicolor* L. Moench) и люцерну серповидную (*Medicago falcata* L.), бактерию *Azospirillum brasilense* SR80 (IBPPM IBPPM24) и гриб *Pleurotus ostreatus* Florida (IBPPM540). Азоспириллу вносили в иммобилизованном на биочаре виде, мицелий гриба - на ячменной соломе. Вегетационный опыт проводили в контролируемых условиях фитокомнаты в течение 2,5 мес. Нефть вносили в количестве 15 г/кг. Засуху моделировали через 30 дней сокращением полива до 30 % от полной влагоемкости. Анализировали всхожесть семян, выживаемость и накопление биомассы растений, содержание фотосинтетических пигментов, продукцию белка, активность ферментов антиоксидантной защиты (ФАЗ) в листьях и корнях, активность почвенных дегидрогеназ, уреаз и пероксидаз, численность гетеротрофной и нефтеокисляющей почвенной микрофлоры, остаточное содержание нефти.

Внесение под растения бактериального и грибного биопрепаратов обеспечило максимальное удаление нефти из почвы на 42 % относительно 9 % в контроле. Морфо-метрические показатели отчетливо свидетельствовали о доминирующем негативном влиянии нефти по сравнению с засухой. На физиолого-биохимическом уровне существенное влияние оказывали и биотические, и абиотические факторы.

Проведенный корреляционный анализ с вычислением коэффициентов корреляции Спирмена выявил многочисленные связи разного знака и интенсивности. Наиболее тесная положительная корреляция отмечена между внесением бактериального препарата и активностью ФАЗ. Противоположный эффект оказывал грибной препарат. Дисперсионный анализ с вычислением многомерного критерия значимости Уилкса показал, что на содержание остаточной нефти значимое влияние оказывало внесение бактериального биопрепарата, а также комплекса бактериального и грибного.

Выявленные изменения морфо-метрических и физиолого-биохимических показателей растений могут служить основой для поиска механизмов ускорения адаптационных процессов формируемых растительно-микробных ассоциаций и повышения эффективности фиторемедиации.

ВОДОРОДНЫЙ ЭЛЕКТРОД НА ОСНОВЕ HYDSL ГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *THIOCAPSA BOGOROVII* В ТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ С ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТЬЮ ТОКА

Цыганков А. А., Стародубов А. С., Зорин Н. А.

ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино

Топливные элементы на основе твердого электролита используют в качестве катализатора платину. Вследствие ограниченности количества и высокой ее стоимости непрерывно проводятся исследования по замене платины другими катализаторами, в том числе ферментами.

Гидрогеназа – это металлофермент, катализирующий обратимую активацию молекулярного водорода. Известны три типа гидрогеназ, отличающиеся по структуре и составу металлов в активном центре: [NiFe] – гидрогеназы, [FeFe]-гидрогеназы и [Fe]-гидрогеназы.

HydSL гидрогеназа пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* (прежнее название *Thiocapsa roseopersicina*) BBS относится к группе 1 железоникелевых гидрогеназ, подгруппе 1e (isp-type). Более 40 лет известно, что этот фермент способен к прямому биоэлектродному катализу при иммобилизации на различные углеродные поверхности. Однако токи, описанные для этого фермента, не превышают 1,5 мА/см². При этом все измерения проводили при погружении электрода в раствор, насыщенный водородом. Анализируя вольтамперные характеристики электрода при разных температурах, нами показано, что в данных условиях скорость электрокатализа лимитируется не активностью фермента.

Учитывая появившиеся в литературе сообщения о возможности работы различных гидрогеназ в сухом иммобилизованном состоянии на электроде, в данной работе изучали активность гидрогеназного водородного электрода в реальном топливном элементе без растворов (в сухом виде) при использовании в виде кислородного электрода платину. Показано, что максимальная мощность свежеобранного ТЭ с HydSL гидрогеназой достигала 3,2 мВт при токе около 5 мА/см². При оценке операционной стабильности обнаружено, что со временем мощность и ток при этой мощности росли. Это свидетельствует о неоптимальной иммобилизации фермента. Через 3500 часов максимальная мощность ТЭ составляла 6,2 мВт при токе более 17 мА/см². Эти значения все еще ниже, чем у ТЭ на основе платины, но существенно выше описанных в литературе для гидрогеназных электродов. Обсуждаются возможности дальнейшего увеличения мощности ТЭ с использованием HydSL гидрогеназы *T. bogorovii*.

Работа поддержана РФФ (грант 19-14-00255).

СЕКЦИЯ: МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ПАТТЕРНЫ ПРИПОВЕРХНОСТНОГО ДВИЖЕНИЯ И АДГЕЗИЯ ВИРУЛЕНТНЫХ И САПРОФИТИЧЕСКИХ *E. COLI*

Абдулкадиева М. М.^{1,2*}, Сысолятина Е. В.³, Васильева Е. В.^{2,3}, Слонова Д. А.^{4,5},
Домнин П. А.^{3,6}, Станишевский Я. М.¹, Ермолаева С. А.³

¹Российский университет дружбы народов, Москва

²Объединенный институт высоких температур РАН, Москва

³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва

⁵ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

⁶МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

* abdulckadieva.maryam@yandex.ru

Введение

Подвижность микроорганизмов способствует их распространению, поиску наиболее благоприятных условий и реализации патогенных свойств. Мы предполагаем, что бактерии с разной экологией могут иметь разные паттерны движения, несмотря на сходное строение.

Целью работы было охарактеризовать траектории приповерхностного движения патогенного и сапрофитического штаммов *E.coli* (ATCC 43890 и M17, соответственно).

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *E.coli* из коллекции НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи: энтерогеморрагический штамм с серотипа O57:H7 ATCC43890 и пробиотический штамм M17. Бактерии помещали в микрофлюидическую камеру так, чтобы высота слоя жидкости составляла 30 мкм, и делали серию видеозаписей. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Plasma 4.0, что позволило восстановить траектории приповерхностного движения бактерий на расстоянии около 10–15 мкм. Микрофотографии паттернов адгезии были получены при помощи флуоресцентной микроскопии после 15 мин инкубации микроорганизмов на поверхности стекла и эукариотических клеток.

Результаты

Было установлено, что сапрофитический штамм *E.coli* M17 дольше оставался в слое жидкости, двигался коллективно и направленно. Вирулентный ATCC 43890, напротив, находился в слое в 3,3 раза меньше по времени, не обладал признаками коллективного движения и перемещался более активно в вертикальном направлении. Рисунок адгезии к пластику и к эукариотическим клеткам также был разным: M17 формировал группы из 10–15 бактерий на пластике и скапливался между клетками, ATCC43890, наоборот, на пластике адгезировался попарно, а на клетках рандомно.

Заключение.

Полученные данные говорят о том, что наблюдаемые разные паттерны приповерхностного движения вирулентных и сапрофитических *E.coli* могут играть роль в эффективности адгезии к абиотическим и биотическим поверхностям.

Работа была поддержана грантом РФФИ 20-34-90127

ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА SARS-ПОДОБНЫХ КОРОНАВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Альховский С. В.^{3,4}, Леншин С. В.¹, Ромашин А. В.², Вышемирский О. И.¹,
Вишневская Т. В.^{3,4}, Булычева Ю. И.³, Львов Д. К.³, Гительман А. К.³

¹Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, с. Веселое

²Сочинский национальный парк, Сочи

³Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи», Москва

⁴Референс-Центр по коронавирусной инфекции

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи», Москва

Введение. Появление вируса SARS-CoV-2 и вызванная им пандемия COVID-19 продемонстрировали важность изучения и контроля зоонозных вирусов непосредственно в природных резервуарах. Основным резервуаром SARS-подобных коронавирусов являются подковоносые летучие мыши (*Rhinolophus* spp.). Ареал подковоносов захватывает и южные регионы России, включая Северный Кавказ и Крым. Настоящая работа посвящена поиску и изучению природных очагов SARS-подобных коронавирусов на территории России и изучению генетических характеристик циркулирующих вирусов.

Материалы и методы. Материал от летучих мышей (фекалии и оральные мазки) был собран на территории Сочинского Национального парка. Всего собраны материалы от пяти видов летучих мышей, включая большого (*R. ferrumequinum*), малого (*R. hipposideros*) и южного (*R. euryale*) подковоносов. Пробы обследованы методом метагеномного анализа (NGS). Зараженность летучих мышей выявленными коронавирусами определена с использованием ПЦР.

Результаты и обсуждение. Выявлены и полногеномно описаны два новых SARS-подобных коронавируса, названные Хоста-1 (по первому обнаружению в пещере Хоста 1) и Хоста-2, циркулирующие в российских популяциях подковоносов на побережье Черного моря (Сочи-Адлер, Россия). Выявленные вирусы формируют отдельную филогенетическую ветвь между вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2. Схожесть белков вирусов Хоста-1 и Хоста-2 с вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2 составляет от 60 до 96 %. Структура рецептор-связывающего мотива S белка у вирусов Хоста-1 и Хоста-2 схожа с другими SARS-подобными коронавирусами. Однако ключевые для связывания рецептора ACE2 позиции и их контекст в RBM вирусов Хоста-1 и Хоста-2 имеют слабое сходство с вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2. В результате ОТ-ПЦР скрининга вирус Хоста-1 выявлен у 14% обследованных подковоносов, Вирус Хоста-2 выявлен у 1,75 %. При этом зараженность вирусом Хоста-1 большого подковоноса в одной из пещер составила 62,5 % (15 положительных проб из 24). Показано, что вирусы выявляются в фекалиях и ротовых мазках летучих мышей, при этом в фекалиях вирусы обнаруживаются в высоком титре.

Заключение. Впервые показано, что на территории России существуют природные очаги SARS-подобных коронавирусов. Циркулирующие здесь вирусы Хоста-1 и Хоста-2 принадлежат «западному» генотипа. Генетическое разнообразие циркулирующих в регионе коронавирусов, их экология и патогенный потенциал требуют дальнейшего изучения.

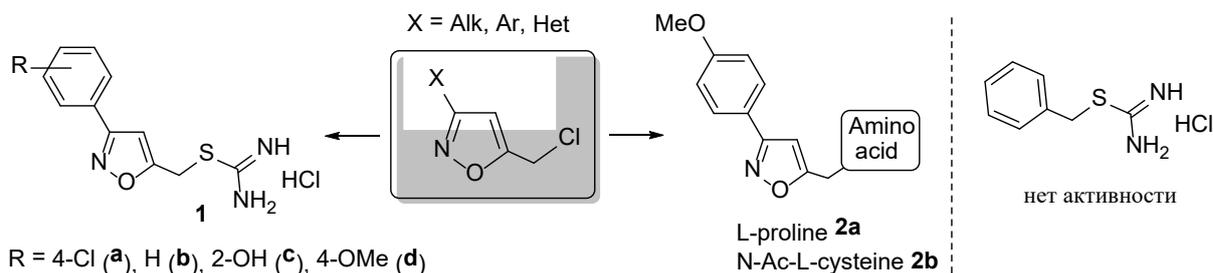
АНТИМИКРОБНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОКСАЗОЛА

Беловежец Л.А., Кондрашов Е. В., Шатохина Н. С.

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, lyu-sya@yandex.ru,

В настоящее время во всем мире наблюдается глобальный рост антибиотикорезистентности микроорганизмов. Несмотря на значительный прогресс в медицине, интенсивность разработки новых антибиотиков за последние 30 лет значительно снизилась. С 2000 по 2017 гг. в мировую медицинскую практику были введены всего лишь 31 новый антибиотик и 2 комбинированных препарата. Сложившийся кризис беспокоит специалистов в области бактериологии, осознающих, что создается катастрофическое положение в области лечения инфекционных заболеваний. С этой точки зрения, поиск новых антибактериальных средств из новых классов соединений является перспективным. Цель данной работы – скрининг антибактериальной активности новых водорастворимых производных изоксазола.

Хорошо известно, что изоксазольный фрагмент является носителем фармакофорных свойств, благодаря чему он входит в состав молекул многих лекарственных субстанций, в том числе антибактериального действия, например, *сульфафуразол*, *сульфаметоксазол*, *оксациллин*. Недавно на основе легкодоступных альдоксимов и 2,3-дихлор-1-пропена мы предложили простой одnoreакторный способ получения 3-органил-5-(хлорметил)изоксазолов – ценных строительных блоков для медицинской химии. Продолжая поиск новых антибактериальных агентов на основе предлагаемых строительных блоков, мы получили ряд водорастворимых конъюгатов изоксазолов с аминокислотами, аминами и сераорганическими соединениями:



Все синтезированные соединения исследовались в концентрациях 0,06–1000 мкг/мл водного раствора. Антимикробная активность анализировалась относительно непатогенных микроорганизмов различных таксономических групп: *Enterococcus durans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Rhodococcus erythropolis*. Показано, что изотиуруриновые соли не обладают активностью в отношении *Escherichia coli*, а их воздействие на тестовые грам-положительные микроорганизмы сильно зависит от заместителя. Так, изотиуруриновые соли **1a** и **1b** незначительно активны против *Enterococcus durans*, в то же время сильно подавляют рост сенной палочки. Особенно это заметно для образца **1b**, минимальная концентрация которого, эффективно замедляющая рост *Bacillus subtilis*, составляет всего 6,2 мкг/мл. Особняком в этом ряду стоят образцы **1c** и **1d**, чрезвычайно активные по отношению к обоим тестовым грам-положительным микроорганизмам. Интересно отметить, что изотиуруриновые соли, не содержащие в структуре изоксазольный цикл, не обладают антибактериальной активностью.

Сочетание в одной молекуле фрагментов изоксазола и аминокислоты не только значительно увеличивает бактериостатическую активность, но и расширяет спектр воздействия. Так, производные пролина **2a** и N-ацетилцистеина **2b** проявляют высокую активность по отношению ко всем исследованным грам-положительным микроорганизмам, включая *Rhodococcus erythropolis*. Вместе с тем, для изоксазола **2a** наблюдается расширение спектра воздействия и на *Escherichia coli*.

Таким образом, исследованные вещества перспективны как антимикробные агенты.

ОМИКСНАЯ ЭРА: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА И СПОСОБЫ БОРЬБЫ С ИНФЕКЦИЕЙ

Беспярых Ю. А., Басманов Д. В., Шитиков Е. А.

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического агентства России, Москва, info@rcpcm.org

На сегодняшний день туберкулез остается одной из актуальных проблем здравоохранения, несмотря на общую тенденцию к снижению заболеваемости впервые выявленными формами. Всестороннее развитие омиксных технологий, а также их взаимная интеграция, позволили по-новому взглянуть на метаболизм клетки. Цель исследования состояла в использовании системного омиксного подхода для выявления особенностей *Mycobacterium tuberculosis*, поиска новых противотуберкулезных препаратов и методов типирования возбудителя.

В исследование включено 50 штаммов *M. tuberculosis*, в том числе выделенные от одного пациента. Дополнительно использован модельный организм *Mycobacterium smegmatis*. Антибактериальную активность определяли для Оливомидина А, Митрамицина А и Хромомидина АЗ. Полногеномное секвенирование и транскриптомный анализ проводили на секвенаторе Illumina HiSeq 2500. Количественное протеомное профилирование проведено с использованием масс-спектрометра Q-Exactive HF.

Установлена ограниченная генетическая вариабельность представителей кластера Beijing B0/W148 (47 ± 13 SNPs) и описано 59 кластер-специфических SNPs, которые, предположительно, ассоциированы с «успешностью». Протеомный анализ выявил особенности генотипа Beijing в представленности белков липидного метаболизма и белках, участвующих в ответе клетки на гипоксию, что подтвердилось результатами транскриптомного анализа. Анализ штаммов от одного пациента выявил девять SNPs, возникших в процессе лечения. Обнаружить изменения в генах и белках, ответственных за вирулентность патогена и проницаемость клеточной стенки. В резистентных штаммах детектировано увеличение представленности белка Rv0469, ответственного за синтез миколовых кислот, который может являться мишенью для новых противотуберкулезных препаратов. Показано, что Оливомидин А обладает антимикобактериальной активностью.

Представленные результаты свидетельствуют в пользу необходимости использования системного подхода для поиска новых мишеней действия препаратов. Детектированные особенности использованы для подбора зондов и разработки нового биосенсора для выявления и типирования возбудителя туберкулеза. Описание вирулентных особенностей *M. tuberculosis* на глобальном системном уровне, безусловно, будет способствовать разработке новых методов борьбы с инфекцией.

Исследование выполнено при поддержке РНФ в рамках проекта № 20-75-10144.

РАЗНООБРАЗИЕ БУРКХОЛДЕРИЙ, ИНФИЦИРУЮЩИХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ, В УСЛОВИЯХ ОГРАНИЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ШТАММА

Воронина О. Л., Рыжова Н. Н., Аксенова Е. И., Кутузова А. В., Кунда М. С., Лазарева А. В., Жилина С. В., Краева Л. А., Гинцбург А. Л.

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, info@gamaleya.org

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, str@nczd.ru

³Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения Москвы, mdgkb@zdrav.mos.ru

⁴Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, pasteur@pasteur.org.ru

Введение. Буркхолдерии, широко распространенные в окружающей среде, выживающие в конкурентном сообществе почвы, благодаря широкой антибиотикорезистентности и разветвленной цепи метаболизма, адаптируются к условиям стационаров и становятся реальной угрозой пациентам в отделениях реанимации и интенсивной терапии. *V. cenocepacia* ST709, 708, 728 известны трансмиссивным распространением в больницах России. ST709 наиболее опасен для больных муковисцидозом (МВ). В условиях усиления мер инфекционного контроля, госпитализации в боксы и индивидуальные палаты сокращается число пациентов, инфицированных эпидемическим штаммом ST709.

Цель. Определить долю и разнообразие буркхолдерий, инфицирующих больных МВ.

Материалы и методы. Респираторные образцы и культуры буркхолдерий анализировали методами мультилокусного секвенирования. Данные генотипирования регистрировали в базе PubMLST.

Результаты и обсуждение. Исследования 2014-2021 гг. Показали, что лидирующим видом среди выявленных у больных МВ буркхолдерий, остается *V. cenocepacia*. Опасение вызывают два региональных аутохтонных генотипа, ставшие эпидемическими: ST208 (ПФО, ЮФО) и ST241 (Амурская область), доля которых не снижается в детской возрастной группе. В ДФО выявлены и другие генотипы этого вида: ST1536, 862. Вероятным источником последнего стали товары из Китая. Работа в Китае привела к инфицированию взрослого пациента ST1537. Визит на остров Маврикий повлек инфекцию ST1899 (первой бактерии *Burkholderia cenocepacia* complex (Vcc), зарегистрированной в Африканском государстве). *V. cenocepacia* ST1772 обнаружили у пациента из Казахстана.

Вид *V. cenocepacia* редок в России. ST438 и 1083 регистрировали только в СЗФО. Однако в 2021 г. изолят этого вида ST9 выделили у пациента из Крыма. *V. contaminans* также расширяет разнообразие. В 2021 добавился новый генотип из Армении (ST1639). Разнообразие *V. stabilis*, впервые выявленной в 2017 у пациента, приехавшего из Украины (ST653), а также *V. gladioli*, заявившей о себе в 2016 у взрослых (ST903), а в 2018 у детей (ST903, 965, 629), не увеличилось в последние 2 года.

Выводы. Рост видового и генетического разнообразия буркхолдерий, выявляемых у пациентов с МВ свидетельствует об ослаблении давления эпидемических штаммов, но подтверждает опасность инфицирования этими бактериями пациентов с данной нозологией. Своевременное выявление буркхолдерии способствует предотвращению хронизации инфекции.

ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ НА МОНОВИДОВЫЕ И МУЛЬТИВИДОВЫЕ БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ-КОММЕНСАЛОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Ганнесен А. В., Мартьянов С. В., Овчарова М. А., Данилова Н. Д., Дювенжи Е. В.,
Киселева А. А., Журина М. В., Бочкова Е. А., Плакунов В. К.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Введение. Кожа является местом обитания микроорганизмов, принадлежащих к множеству филумов. Они формируют в полостях желез, волосяных фолликулов и на поверхности слизистых оболочек мультивидовые сообщества — биопленки. В последние годы показано, что микробиота человека может взаимодействовать с системами его гуморальной регуляции, что делает перспективным исследование влияния гормонов на метаболизм микроорганизмов.

Материалы и методы. Исследовано влияние двух классов гормональных соединений на моно- и мультивидовые биопленки микроорганизмов кожи. Первым типом гормонов — катехоламинами (норадреналин, адреналин) — воздействовали на биопленки *S. epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Kytococcus schroeteri* и *Micrococcus luteus*. Вторым типом гормонов — натрийуретическим пептидом А-типа воздействовали на биопленки *S. epidermidis* и *Cutibacterium acnes*. В исследованиях применяли как классические приемы работы с биопленками, так и современные методы, включая конфокальную микроскопию, количественную ПЦР и RNA-seq.

Результаты и обсуждение. Все исследованные гормоны оказывали дозозависимые эффект на формирование и развитие биопленок микроорганизмов, при этом конечный выход биомассы планктонных культур изменялся мало. Обнаружено, что натрийуретический пептид А-типа (НУП-А) усиливает конкурентные свойства *S. acnes* в сообществе с *S. epidermidis*, что выражалось в увеличенной доле биомассы кутибактерий в бинарной биопленке, хотя стафилококк оставался доминирующей культурой. При этом, НУП-А влиял на способность клеток *S. epidermidis* к коагрегации, что сопровождалось уменьшением размеров конгломератов клеток стафилококков. В сообществе *S. epidermidis* и *S. aureus* эпидермальные стафилококки также преобладали над золотистыми, однако, норадреналин дополнительно усиливал преимущество *S. epidermidis*, что выражалось в увеличении доли биомассы *S. epidermidis* в сообществе. Исследование действия адреналина на *M. luteus* показало, что данный гормон в физиологической концентрации на 80%, стимулирует величину общей биомассы биопленок, при этом не изменяя уровень метаболической активности клеток, что позволяет предполагать стимуляцию гормоном биосинтеза матрикса. Получены данные об изменении экспрессии 7 генов микрококка, в том числе комплекса SufBCD и белка неизвестной функции, обладающего консервативным доменом EAL, что предполагает его потенциальное вовлечение в сигнальную систему ц-ди-ГМФ. Для *K. schroeteri* помощью конфокальной микроскопии показано, что норадреналин оказывает сильное ингибирующее действие на рост и созревание биопленок, что выражается в их утоньшении.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об участии гормонов в регуляции жизнедеятельности сообществ кожной микробиоты, что создает перспективы для управления их метаболизмом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-74-10071.

НЕЙРОМЕДИАТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP. *LACTIS*

Дбар Сария Джоновна

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Saradbar@gmail.com

Введение

Результаты доклинических исследований, опубликованных в течение последнего десятилетия, полностью подтверждают концепцию двунаправленных взаимодействий мозг-кишечник-микробиота, которые регулируется на нервном, гормональном и иммунологическом уровнях, включают центральную нервную систему (ЦНС). Стресс увеличивает проницаемость кишечника и модулирует рост и бактериальную вирулентность как патогенных, так и непатогенных бактерий через эффекты дофамина, адреналина и норадреналина, продуцируемых макроорганизмом. Для экосистемы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека наиболее важными видами микроорганизмов являются молочнокислые бактерии (МКБ), так как они являются постоянными обитателями ЖКТ, пробиотиками, а также бактериальной основой и/или закваской функциональных продуктов.

Цель работы: изучить способность штаммов *L.lactis* ssp. *lactis* к синтезу нейромедиаторов.

Материалы и методы

Для эксперимента были отобраны 7 штаммов *L. lactis* ssp. *lactis*: К-205, 194, 194С, 729, его мутант - штамм 1605 и рекомбинантные штаммы F-116 и F-119.

В динамике их роста в ферментационной среде определяли содержание нейромедиаторов в среде и в культуральной жидкости (КЖ) – супернатанте и в клетках, которые разрушали ультразвуком. Их количество определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304Т («BAS», WestLafayette, США).

Результаты и обсуждения

Установлено, что за 17 часов инкубирования в среде штаммы F-116 и F-119 накапливали 0,15 мкМ/мл и 0,21 мкМ/мл ДОФА, 0,31 мкМ/мл и 0,12 мкМ/мл дофамина, 1,84 мкМ/мл и 0,06 мкМ/мл норадреналина. Штамм К-205 синтезировал норадреналин

(0,06 мкМ/мл). Штамм 194, выделенный из молока коров Бурятии, синтезировал дофамин, серотонин и адреналин параллельно росту культуры, как и штаммы F-116, K-205 и 729, но последние синтезировали в большей степени дофамин. Оксииндолуксусная кислота (5-НИАА), скорее всего, потреблялась штаммами из среды.

Дофамин, адреналин и серотонин, предварительно вносимые в среду, не оказывали статистически значимого влияния на рост F-116 и 729, тогда как дофамин способствовал ускорению роста штаммов K-205 и 194.

Выводы.

Итак, штаммы *L.lactis* ssp. *lactis* не только специфически реагируют на экзогенные нейромедиаторы, но и сами их синтезируют и выделяют в КЖ, где секретированные молекулы могут влиять на другие компоненты микроэкологических систем.

СПОСОБ ОТБОРА ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ, ПРЕОДОЛЕВАЮЩИХ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ПАТОГЕНОВ

Демьянкова М. В.^{1,2*}, Габриэлян Н. И.², Кубанова М. Х.², Кормилицина В. Г.², Шарапченко С. О.², Глухова А. А.¹, Ефименко Т. А.¹, Бойкова Ю. В.¹, Васильева Б. Ф.¹, Малкина Н. Д.¹, Иванкова Т. Д.¹, Терехова Л. П.¹, Садыкова В. С.¹, Ефременкова О. В.¹

¹Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, instna@sovintel.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова, Москва, media.transplant@mail.ru

Введение. Распространение антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов представляет серьезную угрозу для человечества. В связи с этим актуальной задачей является изыскание продуцентов новых эффективных антибиотиков. Целью исследования была интенсификация классического способа выявления продуцентов новых антибиотиков.

Материалы и методы. Исследовали 10 штаммов из коллекции ИНА, выделенные из почв разных регионов европейской части России. Видовую принадлежность актиномицетов определяли по морфолого-культуральным признакам и по анализу гена 16S рРНК. Тестами для определения антибиотической активности помимо коллекционных штаммов были клинические изоляты патогенных грибов (устойчивые к 5-фторцитозину, амфотерицину В, миконазолу, кетоконазолу, итраконазолу, флюконазолу).

Результаты и обсуждение. Отобрано четыре штамма актиномицетов, которые проявляли активность в отношении устойчивых клинических изолятов дрожжей *Candida albicans*, *C. famata*, *C. parapsilosis* и *Cryptococcus neoformans*. Эти штаммы-продуценты идентифицированы как *Nocardia soli* ИНА 01217, *Streptomyces bottropensis* ИНА 01214, *S. chromofuscus* ИНА 01211 и *S. netropsis* ИНА 01190. При сравнении литературных данных и полученных результатов установлено, что антибиотическая активность данного типа ранее не была описана у актиномицетов этих видов.

Заключение. Включение на раннем этапе исследования стадии определения антибиотической активности актиномицетов в отношении клинических изолятов патогенных микроорганизмов позволяет более тщательно и быстро отбирать перспективные штаммы для химического изучения образуемых соединений. Отобрано 4 штамма актиномицетов для химической идентификации образуемых антимикотиков.

АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНИКА ДИПЛОПОД, В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIA*

Ефименко Т. А.^{1*}, Карбанова А. А.¹, Демьянкова М. В.¹, Якушев А. В.², Глухова А. А.¹, Габриэлян Н. И.³, Ефременкова О. В.¹

¹ФГБНУ «НИИНА», Москва

² Факультет почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

³ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва

Введение. Одной из глобальных проблем настоящего времени является антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов при отсутствии достаточного числа эффективных антимикробных препаратов. При этом *Klebsiella pneumoniae* является одной из наиболее распространенных мультирезистентных патогенных бактерий, вызывающих внутрибольничные инфекции.

Целью данной работы являлось изыскание продуцентов антибиотиков, обладающих активностью в отношении устойчивых клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. **Материалы и методы.** Штаммы актинобактерий были выделены из кормовых субстратов диплопод *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp. (гнилой древесины и листового опада, соответственно). Антимикробную активность культуральных жидкостей определяли по зонам задержки роста вокруг лунок по отношению к 12 мультирезистентным штаммам *K. pneumoniae*. Видовую идентификацию штаммов – продуцентов антибиотиков проводили на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК. **Результаты и обсуждение.** На основании антимикробной активности штаммов актинобактерий, выделенных из кормового субстрата многоножек видов *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp., в отношении 11 коллекционных тест-культур бактерий и грибов, были отобраны 10 штаммов – продуцентов антибиотиков и исследована их антимикробная активность в отношении двенадцати клинических изолятов *K. pneumoniae* с различным уровнем чувствительности / резистентности к медицинским антибиотикам. Среди исследованных культур только 3 штамма (5446, 5447 и 5451) показали антибиотическую активность в отношении 5–10 клинических изолятов. **Выводы.** Выявлены и описаны 3 штамма актинобактерий, преодолевающие мультирезистентность штаммов *Klebsiella pneumoniae*, что позволяет их рассматривать в качестве продуцентов перспективных антибиотиков для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными штаммами *K. pneumoniae*.

АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ Г. РЯЗАНИ

Зацаринная Е. А.¹, Лунькова Е. С.², Трунякова А. С.³, Колупаева Н. В.³, Колупаева Л. В.³, Гаськова А. С.¹, Куцкир В. Д.⁴

¹Рязанский государственный университет им. С.А. Есенина

²Рязанский государственный университет им. академика И. П. Павлова

³Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск,

⁴Тюменский государственный университет, microbiog@mail.ru

Говоря о проблеме распространения устойчивости к антимикробным препаратам среди бактерий, в первую очередь рассматривают внутрибольничных возбудителей. Однако антибиотикорезистентность значительно распространилась и среди природных сообществ бактерий. Так, с целью оценки встречаемости и распространения антибиотикоустойчивости среди энтеробактерий, населяющих поверхностные водные объекты на территории города Рязани, в 2016–2017 гг. был произведен отбор проб воды из 27 поверхностных водных объектах города, имеющих рекреационное, декоративное, хозяйственное и природное значение. Было выделено 2441 изолята энтеробактерий, из них 1565 выделены в весенне-летние периоды,

740 осенью и 136 зимой. Энтеробактерии были обнаружены во всех исследованных водных объектах во все сезоны. Их численность во многом зависела от типа самого водоема, особенностей его гидрологического режима, поступления очищенных и неочищенных сточных вод, поверхностного стока, сезона и имела межгодовые отличия. Амплитуда колебаний численности микроорганизмов по сезонам и годам сильно зависит от размера (емкости) водного объекта. Среди бактерий, выделенных за весь период изучения, были идентифицированы представители 10 родов энтеробактерий. Наиболее часто встречались представители *Citrobacter* (36 %), *Escherichia* (21 %), *Providencia* (21 %), реже отмечены *Klebsiella* (8 %), *Enterobacter* (5 %), *Hafnia* (4 %), *Pantoea* (менее 2 %), *Kluyvera* (менее 1 %) *Serratia* (менее 1 %) и *Edwardsiella* (менее 1 %). Межгодовые различия качественного и количественного состава систематических групп энтеробактерий, в проанализированных выборках, оказались менее выражены, чем сезонные.

Уровень устойчивости энтеробактерий к антибиотикам определяли по отношению к 19 препаратам с различным механизмом действия. Анализ данных по антибиотикорезистентности изолятов ($n = 2441$), выделенных в течение всего периода исследований, показал, что устойчивость к антимикробным препаратам распространена повсеместно. Почти все выделенные изоляты ($n = 2437$, 99,8 %) оказались резистентными к одному и более антибиотикам. Фенотипом множественной резистентности (MDR) обладали 2284 изолята (93,6 %), а фенотипом возможной экстремальной резистентности (XDR) — 779 изолятов (31,9 %). В зимний период зафиксировано снижение численности изолятов с фенотипом XDR (7,4 %).

Зарегистрирована относительно высокая частота резистентности изученных штаммов колиформных бактерий в отношении β -лактамовых антибиотиков. В целом низкую эффективность показали ампициллин (71,7 % устойчивых изолятов), имипенем (64,3 %), цефепим (51,6 %) и амикацин (49,5 %). Продукция β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) обнаружена у 53,6 % изолятов. Самым эффективным препаратом, подавляющим рост исследуемых бактерий, среди всех групп использованных антимикробных препаратов, был ципрофлоксацин, только 4,9 % изолятов были устойчивы к его воздействию.

ДЕТЕКЦИЯ *LISTERIA MONOCYTOGENES* МЕТОДОМ ДОТ-БЛОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА ИНТЕРНАЛИНА В.

Калинин Е. В.^{1,2}, Чаленко Я. М.¹, Станишевский Я. М.², Ермолаева С. А.¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

² Российский университет дружбы народов, Москва

Введение и цель работы

Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* — один из основных патогенов человека пищевого происхождения. Для детекции листерий в продуктах питания используются культуральный и молекулярно-генетические методы, которые являются дорогими, трудоемкими и/или время-затратными. Метод дот-блота с детекцией белка, характерного для *L. monocytogenes*, представляет собой быструю и недорогую альтернативу этим методам. Поверхностный белок Интерналин В (InIB) присутствует только у патогенных листерий и хорошо экспрессируется при выращивании листерий на богатой питательной среде, содержащей активированный уголь. Целью работы была разработка тест-системы для выявления *L. monocytogenes* на основе антител к InIB.

Материалы и методы

Ген InIB был клонирован в вектор pET28b, рекомбинантный белок очищен с помощью хроматографических методов и использован для иммунизации кроликов. InIB-специфичные антитела были очищены с помощью иммуносорбции и конъюгированы с HRP. Для идентификации тестируемые штаммы выращивали на среде BHI, содержащей 0,2 % активированный уголь. Выросшие колонии переносили на нитроцеллюлозную мембрану мето-

дом отпечатка, выдерживали в хлороформе и проводили дот-блот с антителами, используя стандартные методы. В работе были протестированы штаммы *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* из коллекции НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи.

Результаты и обсуждение

Положительные результаты были получены со всеми штаммами *L. monocytogenes*, относящимися к разным клональным группам. С другими видами листерий и другими бактериями результат был отрицательный. В смешанных культурах метод позволял достоверно определять наличие *L. monocytogenes*. Прямые высевы из контаминированного молока позволили выявить бактерию через 24 часа.

Заключение

Применяемый подход показал высокую специфичность и может применяться для выявления патогенных листерий, что облегчит процедуру скрининга.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-38-90260 ЕК).

новые подходы к ТЕРАПИИ СМЕШАННЫХ ИНФЕКЦИЙ

Каюмов А. Р., Тризна Е. Ю., Миронова А. В., Федорова М. С., Каримова А. В.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Исследования последних десятилетий показали, что 90 % всех известных микроорганизмов в естественных условиях предпочтительно существуют в виде многоклеточных сообществ – биопленок. При этом многие инфекции связаны с образованием смешанных биопленок, межвидовые взаимодействия в которых приводят к повышенной устойчивости к антимикробным препаратам и высокой вирулентности. Помимо синергетических взаимоотношений, в полимикробных сообществах также встречаются антагонистические благодаря образованию различных метаболитов, которые могут как понижать чувствительность одних членов консорциума к антибиотикам (например, метаболиты синегнойной палочки), так и наоборот, в отдельных случаях наблюдается повышение чувствительности всего сообщества к антибиотикам широкого спектра действия.

Мы показали, что ванкомицин, цефтриаксон и тетрациклин, неактивные против *P. aeruginosa*, приводили к частичной гибели клеток *S. aureus* в моновидовой биопленке, тогда как в составе полимикробной биопленки, *S. aureus* оставались живыми в нижних слоях благодаря диффузному барьеру благодаря матриксу биопленки *P. aeruginosa*, и становились нечувствительны к данным антибиотикам. В присутствии ципрофлоксацина, гентамицина и амикацина, которые активны против обоих штаммов, значимое снижение числа жизнеспособных клеток и *S. aureus* и *P. aeruginosa* в полимикробном сообществе наблюдалось при концентрациях антибиотиков в 4–8 раза ниже, чем для монокультур обоих штаммов. В случае внедрения одного штамма к сформированной биопленке другого штамма также было установлено повышение эффективности антибиотиков широкого спектра действия против бактерий в составе биопленки. Наиболее ярко данный эффект был выражен для аминогликозидов. Кроме того, при добавлении культуральной жидкости золотистого стафилококка наблюдалось также повышение эффективности всех антибиотиков широкого спектра действия, а при инкубации в концентрированной культуральной жидкости наблюдалась полная гибель синегнойной палочки в составе биопленки. Вероятно, подобные результаты являются следствием биосинтеза внеклеточных метаболитов клетками *S. aureus*, которые негативно влияют на жизнеспособность *P. aeruginosa* в составе биопленки, однако природа данных соединений и механизм их действия остается неизученным. Поиск и идентификация факторов антагонизма *S. aureus* позволит использовать их в качестве антагонистов для борьбы с патогенной микрофлорой и повышения эффективности антибиотикотерапии при бактериальных инфекциях различного рода, а получение и продукция молекул позволит создавать новые антимикробные препараты.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского Научного Фонда (№15-14-00046 и 20-64-47014).

ОЦЕНКИ ЭНТРОПИИ ПРИ АНАЛИЗЕ СТРУКТУРЫ ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ НА ПРИМЕРЕ SARS-COV-2

Орлов Ю. Л.^{1,2*}, Лузин А. Н.², Дергилев А. И.², Юнусов В. В.², Обозина А. С.¹

¹Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

²Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск

³Институт молекулярной биологии РАН, Москва

* E-mail: orlov@d-health.institute

Актуальность и цель работы. Эпидемии вирусных заболеваний, таких как коронавирус COVID-2019, представляют серьезную угрозу населению мира. Анализ геномных перестроек и мутаций вируса с целью оценки рисков и контроля представляет глобальный вызов для здравоохранения. Постоянно пополняемые данные по геномному секвенированию коронавируса (SARS-CoV-2) дают детальный материал для анализа структуры генома и возможности его диагностики с помощью секвенирования. Ставилась задача оценки нуклеотидных повторов в геноме коронавируса с помощью оценок сложности текста и энтропии.

Материалы и методы. Использовались данные GenBank для реконструкции филогенетического дерева штаммов COVID-2019 и SARS. Исследование структуры повторов геномов прокариот позволяет найти эволюционные взаимоотношения между различными видами, в том числе для коронавирусов. Использовалась собственная компьютерная программа для оценки межгеномного расстояния по числу перестроек последовательностей. Оценки сложности текста в целом важны как для анализа структуры генетического текста, выявления эволюционного происхождения и сравнения полных геномов.

Результаты и обсуждение. Использован модифицированный алгоритм Лемпеля-Зива сжатия текста для оценки структуры повторов в геноме коронавируса. Представлено применение оценок сложности текста (лингвистическая сложность, энтропия) для исследования структуры последовательностей. Определены участки низкой сложности текста в геноме коронавируса, построено дерево сходства для родственных вирусов.

Заключение. Несмотря на беспрецедентные меры по борьбе с эпидемией продолжается рост числа инфицированных, растет смертность. Научные направления включают разработку диагностик, дизайн возможных ингибиторов связывания эпитопов COVID-2019, включая мутантные формы. Необходима разработка новых теоретических подходов для оценки вирулентности, анализа происхождения штаммов. Разработка программ биоинформатики для геномного анализа была поддержана грантом РФФ 19-15-00219.

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И *ACINETOBACTER BAUMANNII*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРОВИ И ЛИКВОРА У ДЕТЕЙ

Садеева З. З.^{1*}, Комягина Т. М.¹, Алябьева Н. М.¹, Новикова И. Е.¹,
Шакирзянова Р. А.¹, Лазарева А. В.¹, Вершинина М. Г.¹

¹Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей
Федеральное государственное автономное учреждение Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, director@nczd.ru

* zulfiryasadeeva@yandex.ru

Введение: Инфекции кровотока и ЦНС, вызванные неферментирующими грамотрицательными бактериями, являются опасной и серьезной проблемой в педиатрической практике.

Цель: Оценка чувствительности, определение генов резистентности и сиквенса типов у штаммов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*.

Методы: С 2014 по 2020 гг. было отобрано 25 штаммов *P. aeruginosa* (РА) и 14 штаммов *A. baumannii* (АВ). Чувствительность к антибиотикам определяли методом микроразве-

дений в бульоне. Детекцию карбапенемаз осуществляли методом ПЦР в реальном времени. Сиквенс типы (ST) определяли методом мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ).

Результаты: Среди изученных штаммов к карбапенем-резистентным (карб-Р) относились 19 (76 %) изолятов *PA* и 10 (71 %) штаммов *AB*. У 13 (68 %) карб-Р изолятов *PA* был найден ген *bla_{VIM}*. Среди карб-Р изолятов *AB* пять штаммов имели ген OXA-40, три штамма – OXA-23. При проведении МЛСТ у штаммов *PA* было выявлено 12 разных ST. При этом карб-Р штаммы включали ST654- девять (48 %) штаммов, ST235 – четыре штамма, ST155 – два штамма и по одному штамму относились к ST260, ST2295, ST2592, ST309. Карбапенем-чувствительные (карб-Ч) штаммы *PA* включали ST270, ST773, ST1031, ST412 и ST2326. У штаммов *AB* было выявлено девять ST, два из них ранее не были представлены в базе данных МЛСТ. Карб-Р изоляты относились к ST944^{Oxf} – три штамма, ST1100^{Oxf} и ST1102^{Oxf} – по два штамма, и по одному штамму относились к ST1104^{Oxf} и ST281^{Oxf}. У одного штамма выявлен новый ST2420^{Oxf}. Карб-Ч штаммы были представлены ST450^{Oxf}, ST1127^{Oxf}. Впервые описанный ST2419^{Oxf} включал один изолят.

Выводы: Резистентность штаммов *PA*, выделенных из крови и ликвора у детей чаще всего обусловлена наличием металло- -лактамазы VIM, а у штаммов *AB* – наличием OXA-40 и OXA-23. Наиболее часто среди изученных штаммов *PA* встречались ST654, ST235, ST155, ST270, а у штаммов *AB* – ST944^{Oxf}, ST1100^{Oxf}, ST1102^{Oxf}, ST450^{Oxf}.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ ЭРОГОРГИАЕНА ЯВЛЯЕТСЯ ИНГИБИТОРОМ АЛАРМОН СИНТЕТАЗ И ПОДАВЛЯЕТ ПЕРСИСТЕНЦИЮ МИКОБАКТЕРИЙ

Сидоров Р. Ю.^{1,2}, Ахова А. В.^{1,2}, Кашеварова Н. М.¹, Ткаченко А. Г.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов, филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, sidorov.r@iegmu.ru

Персистенция бактерий приводит к рецидивам хронических инфекций, в том числе туберкулёза. Алармоны (p)ppGpp являются продуктом активности ферментов (p)ppGpp-синтетаз бактерий и способствуют формированию персисторных клеток. Ингибиторы этих ферментов потенциально могут рассматриваться как новый класс антибиотиков, предотвращающих образование персисторных клеток.

Исследован механизм действия нового антибактериального соединения DMNP, которое является синтетическим производным эрогоргиаена, природного антибиотика, выделенного из морского коралла *Antillogorgia elizabethae*. Показан ингибирующий эффект DMNP на активность ферментов (p)ppGpp-синтетаз микобактерий. Для этого нами сконструированы генно-инженерные штаммы *Mycobacterium smegmatis* с делециями генов *rel_{Msm}* и *relZ*, кодирующих (p)ppGpp-синтетазы у этого вида, а также сверхэкспрессионные плазмиды с вставками указанных генов, индукция которых в трансформированных штаммах сопровождалась повышенным образованием белков Rel_{Msm} и RelZ, обладающих (p)ppGpp-синтетазной активностью.

Штаммы с делециями генов имели пониженную выживаемость по сравнению с штаммом-родителем при воздействии на них DMNP, тогда как индукция сверхэкспрессии белков Rel_{Msm} или RelZ повышала выживаемость клеток в присутствии DMNP. Таким образом, как Rel_{Msm}, так и RelZ могут рассматриваться в качестве мишеней DMNP. Ферментативную активность очищенного Rel_{Msm} определяли по изменению концентрации субстрата (ГТФ) и продукта ((p)ppGpp) в ходе *in vitro* реакции. Полученные результаты показали, что активность Rel_{Msm} в присутствии различных концентраций DMNP ингибировалась по принципу доза-эффект. При помощи метода молекулярного докинга мы спрогнозировали возможный механизм взаимодействия DMNP и (p)ppGpp-синтетаз: аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание ГТФ или локализованные поблизости от активных сайтов Rel_{Msm} и RelZ белков, могли быть вовлечены во взаимодействие DMNP с этими белками, приводя к ингибированию их активностей.

Таким образом, DMNP может служить в качестве перспективного лидерного соединения для разработки средств антитуберкулезной терапии, основанных на подавлении образования персистерных клеток и эффективных против хронических и рецидивирующих туберкулезных инфекций.

Исследование выполнено по гранту Российского научного фонда № 18-73-10156.

ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩИЙ БЕЛОК TAG-7/PGLYRP1 — ИНГИБИТОР ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАТОГЕНОВ

Слонова Д. А.^{1,2,*}, Посвятенко А. В.², Сысолятина Е. В.³, Ермолаева С. А.³,
Кибардин А. В.², Лысюк Е. Ю.², Северинов К. В.¹, Ларин С. С.²

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва

²ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

³ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

*Darya.a.slonova@gmail.com

Инфекционные заболевания входят в число 10 основных причин смерти согласно отчету ВОЗ. Среди них выделяют инфекции, вызванные внутриклеточными патогенами (туберкулез, менингококковая инфекция, бруцеллез и другие). Жизненный цикл таких бактерий состоит из принудительного фагоцитоза клетками хозяина, репликации внутри этих клеток и дальнейшей миграции в другие ткани и органы, минуя встречи с иммунной системой хозяина. Инфекции, вызванные такими патогенами, наиболее опасны для беременных, пожилых людей и для людей с ослабленным иммунитетом. Лечение проводится антибиотиками, однако в последнее время стали применять комплексную терапию, направленную на усиление внутренней защиты организма. Одним из элементов системы раннего распознавания патогенов является пептидогликан распознающий белок Tag-7/PGLYRP1. **Целью** работы было исследовать влияние белка Tag-7/PGLYRP1 на модельные патогены *Listeria monocytogenes* и *Salmonella enterica*, возбудителей пищевых внутриклеточных инфекций листериоза и самонеллеза соответственно, и их взаимодействие с компонентами врожденного иммунитета.

С помощью эукариотической экспрессионной системы был получен рекомбинантный человеческий белок Tag-7/PGLYRP1. Используя лабораторные штаммы и различные клинические изоляты, была показана способность этого белка связываться с клеточными стенками грамположительных и грамотрицательных бактерий. Анализ влияния Tag-7/PGLYRP1 на рост бактерий *L. monocytogenes* и *S. enterica* показал, что исследуемый белок не проявляет прямой бактерицидной и бактериостатической активности в используемых концентрациях. Однако присутствие Tag-7/PGLYRP1 может усиливать чувствительность *L. monocytogenes* к некоторым антибактериальным препаратам.

С использованием модельной клеточной системы мышинных макрофагоподобных клеток ANA-1 продемонстрировано, что присутствие Tag-7/PGLYRP1 стимулирует фагоцитоз бактерий. На модели *in vitro* инфекции показано, что Tag-7/PGLYRP1 ингибирует внутриклеточное выживание *L. monocytogenes* и *S. enterica*, предохраняя эукариотические клетки от дальнейшего распространения патогенов через горизонтальные межклеточные контакты. Аналогичные результаты были получены в человеческих макрофагах и дендритных клетках. С помощью иммуноферментного анализа было зафиксировано значительное увеличение секреции интерлейкина 6 клетками ANA-1 после обработки *L. monocytogenes* белком Tag-7/PGLYRP1.

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что эволюционно консервативный паттерн-распознающий белок Tag-7/PGLYRP1 играет роль молекулярного сенсора патогенов внутри клеток хозяина, что приводит к ингибированию внутриклеточной выживаемости бактерий и может быть использовано при разработке подходов к комплексной терапии внутриклеточных инфекций.

ПРОИЗВОДНЫЕ ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗАМИНОИНДОЛОВ — НОВАЯ ГРУППА СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Степаненко И. С., Ямашкин С. А.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
им. Н. П. Огарева»

Введение. Ежегодно от инфекционной патологии в мире погибают около двадцати миллионов человек. Ежегодная заболеваемость инфекционными заболеваниями исчисляется сотнями миллионов случаев. Трудности лечения и профилактики инфекционных заболеваний, обусловленные разнообразием биологических форм возбудителей, колоссальной адаптационной способностью микроорганизмов и постоянным возникновением форм с множественной резистентностью, появлением новых видов микроорганизмов, определяют актуальность проблемы создания новых противомикробных препаратов. Цель исследования: разработка, получение нового класса синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и научно-практическое обоснование безопасного использования выявленной противомикробной активности индолиламинов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

Материалы и методы. Для достижения цели и решения поставленных задач использовались классические и модернизированные методы органического синтеза. Для прогноза потенциальной биологической активности *in silico* использовалась компьютерная система прогнозирования биологической активности веществ PASS. Для исследований *in vitro* использовались метод серийных разведений в бульоне и диско-диффузионный метод (ДДМ); методика проведения опытов при воздействии исследуемых соединений в физиологическом растворе при комнатной температуре и коротких экспозициях, тест Эймса, SOS-хромотест, МТТ-теста. Для исследований *in vivo*: острую токсичность определяли с использованием лабораторных животных (мыши и крысы), модель экспериментальной хирургической раневой инфекции.

Результаты и обсуждение. Предложено и обосновано научное направление по получению и изучению нового поколения противомикробных соединений анилидной группы. Выявлена противомикробная активность замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов в результате исследования более 3000 штаммов опытных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Показана эффективность потенциальных противомикробных соединений, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции, вызванной грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами в условиях *in vivo*.

Выводы. Результаты настоящей работы значительно расширяют существующие представления о соединениях обладающих противомикробной активностью, как с точки зрения микробиологии прокариот, так и в аспекте фармакологии лекарственных средств. На основе скрининга получена и исследована новая серия синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, обладающих противомикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Полученные результаты являются основанием для дальнейшего исследования синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов с целью клинического применения изученных соединений в качестве противомикробных препаратов.

МЕТАБИОТИКИ НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ

Стоянова Л. Г.

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, stoyanovamsu@mail.ru

Введение. В последнее десятилетие мнение медиков об эффективности «живых» пробиотиков изменились, поскольку во многих случаях метаболиты пробиотиков (метабитики)

лучше восстанавливают естественную микробиоту, поддерживая ее развитие в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), Метабиотики имеют более четкие мишени приложения в макроорганизме, лучше метаболизируются, быстрее элиминируются из макроорганизма, Иммунологи рассматривают применение бактериальных лизатов как очень перспективное направление повышения антиинфекционного и противовирусного иммунитета и лечения вторичных иммунодефицитов, поскольку препараты не содержат живые бактериальные культуры. Лактококковая вакцина обеспечивала лучшую защиту от респираторной пневмококковой инфекции, чем вакцинация очищенным антигеном. Молочнокислые бактерии (МКБ) целенаправленно используются при изготовлении лечебно-профилактических продуктов при ряде заболеваний и все еще обладают большим потенциалом для исследований.

Цель работы: сравнение метабиотических свойств природных штаммов МКБ и их лизатов.

Методика. Для выделения МКБ использованы национальные молочнокислые продукты лечебно-профилактического назначения из разных климатических зон России, Ливана, Ирана. Перспективные штаммы идентифицированы как *Lactobacillus diolivorans*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. В динамике роста штаммов определено время культивирования для максимального накопления полезных метаболитов (лактата, летучих жирных кислот, антиоксидантов и бактериоцинов и фунгицидов (Stoyanova et al., 2016). Антимикробную активность штаммов определяли как в КЖ, так и в их лизатах, полученных обработкой КЖ с клетками ацетон-уксусной смесью, нейтрализованной фосфатным буфером.

Результаты. В ходе эксперимента была выявлена разная антагонистическая активность против условно-патогенных микроорганизмов, включая *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger*, *Candida albican*. Бактерицидная активность у ряда штаммов была выше на 25–30 % в лизатах, чем в КЖ. Фунгицидная активность проявлялась на более поздней стадии роста МКБ, на одинаковом уровне при сохранении полезных метаболитов.

Выводы. Применение метабиотиков на основе пробиотических штаммов МКБ, может облегчить и ускорить процесс выздоровления при ряде заболеваний. Бактериоцины как биоактивные пептиды могут быть использованы в качестве сильнодействующих лекарств, обладающих четко выраженными фармакологическими эффектами как альтернатива антибиотикам.

Reference: Stoyanova et al. *Journal of Hygienic Engineering and Design, Consulting and Training Center KEY (Skopje)*, 2016.16, 19-27.

ВЛИЯНИЕ ОКСОПРОИЗВОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ НА БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI*

Триандафилова Г. А. Смирнова Г. В., Тюленев А. В., Октябрьский О. Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра, Пермь, info@iegm.ru
ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, enter@pstu.ru

Показан значительный вклад микробиома кишечника человека в развитие не только заболеваний желудочно-кишечного тракта, но и центральной нервной системы, диабета и ожирения. Влияние на состав и активность микробиома оказывают лекарственные препараты. Многие из них, не являясь антибиотиками, могут в той или иной мере проявлять бактериостатическое или бактерицидное действие в отношении отдельных представителей микробиома кишечника. С другой стороны, бактерии могут вызывать биотрансформацию лекарственных препаратов. Вследствие этого, при разработке новых лекарственных веществ необходимо определение фармакомикробиомных показателей исследуемых соединений. В связи со сложностью культивирования *in vitro* отдельных представителей микробиома первым шагом в прогнозировании взаимодействия молекула – микробиом может стать скрининговое исследование активности исследуемых веществ с применением микробных тест-систем.

Целью работы было изучение влияния ряда оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов на генно-инженерные штаммы бактерий *E. coli*. Использовали штаммы *E. coli* NM3012 и NM3021, несущие генные слияния *sulA::lacZ* и *katG::lacZ*, соответственно, а также BW25113 (родительский тип). Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК), удельной скорости роста и колониеобразующей способности (КОЕ) проводили по стандартным методикам, используя планшеты. Экспрессию генов определяли по активности -галактозидазы. *Real-time* мониторинг дыхания и продукции сульфид-иона проводили с использованием электрода Кларка и сульфид-специфичного ионоселективного электрода.

Установлено, что для 6 из 32 тестируемых соединений, МИК составила меньше 1 мМ. В микроаэробных условиях достоверное снижение скорости роста и уровня КОЕ при действии двух близких аналогов CBR-384 и CBR-386 в концентрациях, равных МИК, наблюдалось только после добавления CBR-384. При этом скорость роста восстанавливалась до нормального уровня после одного часа инкубации. При выращивании бактерий в аэробных условиях соединение CBR-384 необратимо снижало скорость роста до минимальных значений, а при добавлении CBR-386 наблюдалось двухфазное ингибирование. *Real-time* мониторинг дыхания и продукции сульфид-иона при действии обоих веществ выявил ингибирование дыхательной функции и увеличение продукции сульфид-иона, совпадающее по времени с ингибированием удельной скорости роста бактерий. Не отмечено влияния исследуемых веществ на экспрессию исследованных генов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90016.

ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА К БЕДАКВИЛИНУ И ЛИНЕЗОЛИДУ

Уштанит А. И.¹, Михайлова Ю. Д.², Перетокина И. В.², Крылова Л. Ю.², Макарова М. В.², Сафонова С. Г.², Борисов С. Е.², Зименков Д. В.¹

¹Центр высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, isinfo@eimb.ru

²ГБУЗ города Москвы «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Актуальность: Туберкулез каждый год уносит миллионы жизней во всем мире. В настоящее время всё чаще встречается туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью (XDR) и тотальной (TDR). Однако во избежание высокого роста заболеваний требуется быстро и четко определять резистентность микобактерии туберкулеза не только к противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда, но и к современным препаратам — бедаквилину и линезолиду, активно используемым с 2014 года.

Цель работы: Выработка микробиологических критериев устойчивости возбудителя туберкулеза к бедаквилину и линезолиду. Определение спектра мутаций, приводящих к устойчивости, анализ ассоциированных микроэволюционных событий.

Материалы и методы: Изоляты от пациентов, проходящих лечение в МНПЦБТ, исследовались комплексом фенотипических (определение МИК препаратов на плотных и жидких средах) и молекулярных методов (MIRU-типирование, таргетное и полногеномное секвенирование).

Результаты и обсуждение: Значения эпидемиологических точек отсечения (ECOFF) бедаквилину для изолятов дикого типа были определены на уровне 0,06 мг/л и 0,25 мг/л для плотной и жидкой среды, соответственно. Эти значения значительно ниже утвержденных в настоящее время критических концентраций, равных 0,25 мг/л и 1 мг/л. Повышение МИК бедаквилина коррелирует с накоплением мутаций в гене *rv0678*, распределенных по всей длине рамки считывания. При сохранении бактериовыделения в процессе терапии выявляются также и штаммы с заменами в с-субъединице АТФ-синтазы, кодируемой геном *atpE*:

обнаружена новая замена A63L, полногеномным секвенированием подтверждено одновременное наличие G25S и D28G в ранее описанном случае.

Одиннадцать из 15 устойчивых к линезолиду штаммов относились к кластеру 94–32 семейства Beijing. Замена C154R в рибосомальном белке RplC – основной механизм устойчивости в клинических штаммах, – ассоциирована как с низкими, так и с очень высокими МИК линезолида.

Выводы: Большое разнообразие обнаруживаемых мутаций и нечеткость микробиологических критериев резистентности затрудняет создание тест-систем для детекции устойчивых к бедаквилину форм возбудителя туберкулеза. Выявление сложных, мультинуклеотидных, мутаций свидетельствует о сильном эволюционном давлении отбора на фоне терапии новейшими препаратами. Нельзя исключать потенциальную возможность селекции способных к трансмиссии тотально-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ МЕТАБОЛИТА МОРСКИХ КОРАЛЛОВ ПОДАВЛЯЕТ ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНК МИКОБАКТЕРИЯМИ

Цыганов И. В.^{1,2}, Сидоров Р. Ю.^{1,2}, Нестерова Л. Ю.^{1,2}, Ткаченко А. Г.^{1,2}

¹ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов», Пермь.

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, zamegagurrendan@gmail.com

Способность микобактерий образовывать биопленки, содержащие персистирующие клетки, является фактором, осложняющим течение туберкулезной инфекции, вызываемой *Mycobacterium tuberculosis*. Формирование персистеров происходит в ответ на стрессорные воздействия и находится под контролем стринджент факторов, ответственных за синтез алармона гуанозинтетрафосфата – (p)ppGpp. Нами сделано предположение, что алармоны могут также играть существенную роль в образовании биопленок у микобактерий. Ранее нами показано, что DMNP, синтетический аналог природного антибиотика, выделенного из морского коралла *Antillogorgia elizabethae*, может эффективно подавлять персистенцию микобактерий. Целью настоящей работы является изучение возможного эффекта DMNP на образование биопленок непатогенными микобактериями *M. smegmatis* mc² 155.

Поверхностные биопленки родительского штамма, а также мутантов с делециями генов *rel_{msm}* и *relZ*, кодирующих (p)ppGpp синтетазы *M. smegmatis*, выращивали на жидкой питательной среде в чашках Петри (диаметр 35 мм) в присутствии разных концентраций DMNP, фотографировали для фиксации структурных изменений и, после удаления планктонной среды и высушивания, оценивали гравиметрически.

В ходе исследования установлено, что штаммы с одинарной и двойной делециями *rel_{msm}* и *relZ* имели дефекты в биопленкообразовании: поверхностные биопленки фрагментировались, слипались и образовывали агрегаты на поверхности среды и на дне чашки. В отличие от этого, использование делеционных мутантов, трансформированных сверхэкспрессионными плазмидами с вставками соответствующих генов, показало, что сверхэкспрессия соответствующих генов восстанавливала способность клеток образовывать биопленки. Эффект сублетальных концентраций DMNP демонстрировал аналогичную фенотипическую картину, что и делеционные штаммы без антибиотика. Более того, делеционные мутанты были более чувствительны к антибиотику: минимальная бактерицидная концентрация и минимальная концентрация, разрушающая биопленку, уменьшались с ростом числа нокаутов. Увеличение концентрации DMNP в конечном итоге приводило к полной гибели клеток.

Таким образом, действие DMNP, направленное на микобактериальные стринджент факторы Rel_{msm} и RelZ, приводит к нарушению формирования биопленок, что делает перспективной разработку на его основе лекарственных средств, эффективных против хронических и рецидивирующих туберкулезных инфекций.

Исследование выполнено по гранту Российского научного фонда № 18-73-10156

БАКТЕРИОФАГИ И ИХ ФЕРМЕНТЫ КАК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ

Шадрин А. М.¹, Копосова О. Н.¹, Скорынина А. В.¹, Бузиков Р. М.¹, Казанцева О. А.¹,
Пилигримова Э. Г.¹, Кулябин В. А.¹, Рябова Н. А.², Хлопова К. В.³, Тимофеев В. С.³

¹Лаборатория биологии вирусов бактерий, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, andrey2010s@gmail.com, andrey.shadrin@ibpm.ru

²Лаборатория микробиологии сибирской язвы, ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

³ФГБУН Институт белка РАН, Пущино

Введение. Бактериофаги – одна из наиболее разнообразных форм жизни на Земле. Считается, что бактериофаги ежедневно уничтожают около 20 % популяции бактерий. В начале прошлого десятилетия была ярко обозначена проблема появления новых штаммов бактерий с множественной устойчивости к антибиотикам. При сохранении интенсивности исследований в области антибактериальных веществ на прежнем уровне, ожидается, что количество смертей от инфекционных заболеваний, вызванных устойчивыми к классическим антибиотикам бактериями, к 2050 г. опередит количество смертей, вызванных сердечно-сосудистыми заболеваниями и раком.

Материалы и методы. Антибактериальную активность фагов и их бактериолитических ферментов тестировали на жидких и твердых средах. Бактериолитические ферменты выделяли рекомбинантных штаммов-продуцентов *E. coli* BL21(DE3) рЕТ. В работе использовали бактериофаги izhevsk, kirov, vB_BcM_Sam46, vB_BcM_Sam112, vB_BtS_B83 и эндолизины Ply57, Ply46, Ply112, PlyB83, PlyG и Ply35.

Результаты и обсуждение. Среди протестированных бактериофагов наиболее широким спектром антибактериальной активности обладал бактериофаг izhevsk. Его эндолизин, Ply57 также демонстрировал наиболее высокую термостабильность по сравнению эндолизинами других бактериофагов. Активность Ply57, Ply35 и PlyG была максимальной при 150 мМ NaCl, в то время как активности Ply46, Ply112 и PlyB83 достигали максимума в отсутствие NaCl. С другой стороны, Ply57 и Ply35 были активны в диапазоне pH от 6.0 до 8.0, тогда как Ply46 и Ply112 демонстрировали максимальную активность при pH 6.0, а PlyG и PlyB83 при pH 8.0.

Заключение. Спектры чувствительности бактериальных штаммов к фагам отличились от спектров чувствительности эндолизинотех же фагов. Также отмечено, что спектры чувствительности штаммов к фагам и их эндолизинам зависят от метода определения бактериолитической активности.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ *NEISSERIA GONORRHOEA*: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Шаскольский Б. Л., Кандинов И. Д., Кравцов Д. В., Горшкова С. А., Винокурова А. С.,
Дементьева Е. И., Грядунов Д. А.

Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, isinfo@eimb.ru

Цель работы: установление детерминант лекарственной устойчивости (ЛУ) *N. gonorrhoeae* в России и мире, выявление генетических особенностей доминирующих за последние 10 лет линий (сиквенс-типов, ST) возбудителя в России (ST 807) и в мире (ST 225, 1407, 2400, 2992, 4186).

Материалы и методы: выполнено полногеномное секвенирование и сборка геномов 25 изолятов геногруппы 807 на платформе MinION (Oxford Nanopore technologies). Разработан гидрогелевый биочип для идентификации детерминант ЛУ в генах *penA*, *ponA*, *porB*, ассоциированных с устойчивостью к цефтриаксону – современному препарату выбора для лечения гонореи.

Результаты: Сравнительный полногеномный анализ наиболее распространенных в настоящее время в России и в мире ST возбудителей выявил кандидатные геномные маркеры адаптивного преимущества для каждой группы изолятов. Так, изоляты ST 1407 характеризовались XXXIV типом аллели гена *penA*, снижающей чувствительность к цефтриаксону. ST 225 обладал уникальной аллелью гена токсина *mafB* и белка семейства повторов *SEL 1L*, вовлеченного в механизмы ухода от иммунного ответа хозяина. Российские изоляты ST 807 характеризовались аллелью гена *mafA*, продукт которого ассоциирован с вирулентностью, адгезией и трансцитозом. Анализ расположения мобильных элементов на фоне геномных перестроек в хромосоме *N gonorrhoeae* позволил установить роль IS элементов Ngo2, элементов Корреи, профагов Ф2, Ф7, Ф8 и подтвердить, что изменение порядка генов на хромосоме способно меняться быстрее их нуклеотидных последовательностей. Предложен способ предсказания уровня фенотипической чувствительности к цефтриаксону посредством идентификации мутаций с использованием разработанного биочипа и регрессионной модели, построенной на характеристиках 5812 изолятов *N. gonorrhoeae* из разных регионов мира.

Выводы. Филогенетический анализ доминирующих линий *N. gonorrhoeae* в России и в мире показал соответствие результатов полногеномного секвенирования и мультиантигенного секвенирования-типирования. Каждая из линий имела от 8 до 20 генов с уникальными аллелями, отличными от других. Не обнаружено взаимосвязей между геномными перестройками и филогенетической близостью изолятов. Различие функций, характерных для рассмотренных типов, вероятно обусловлено не только нейтральным дрейфом генов, но и разными стратегиями, направленными на выживание в организме хозяина и обеспечивающими доминирование в популяции гонококка.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 17-75-20039.

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Шлеева М. О.^{1*}, Савицкий А. П.¹, Линге И. А.², Апт А. С.², Капрельянц А. С.¹

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН, Москва

²ФГБНУ «ЦНИИТ» РАН, Москва

*margoshleeva@gmail.com

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) может переходить в состояние покоя, вызывая латентную стадию туберкулеза (ТБ). Покоящиеся микобактерии приобретают устойчивость ко всем известным антибактериальным препаратам, они также способны десятилетиями выживать в организме человека и становиться активными, вызывая активную форму заболевания. Для лечения латентного туберкулеза необходима разработка новых подходов. Мы создали модель для *Mtb* и быстрорастущей актинобактерии *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*), которая имитирует состояние возбудителя туберкулеза в латентной форме ТБ. Покоящиеся клетки *Msm* накапливают копропорфирин III и уропорфирин III, а также их метиловые эфиры. Поскольку порфирины используются в качестве фотосенсибилизаторов при лечении некоторых видов опухолей и кожных инфекций методами фотодинамической терапии, целью работы являлась проверка гипотезы о возможной фотодинамической инактивации (ФДИ) покоящихся форм микобактерий. В клетках *Msm* содержание порфиринов, оцененное методом ВЭЖХ, было выше, чем в покоящихся культурах *Mtb*. Наибольшая инактивация покоящихся клеток *Msm* наблюдалась при воздействии света с длиной волны 395 и 575 нм. Проведение ФДИ с покоящимися клетками *Mtb* оказалось не эффективным из-за низкого содержа-

ния порфиринов. Для стимуляции синтеза порфиринов к культурам *Mtb* в период перехода в состояние покоя, был добавлен предшественник в цепи биосинтеза гема – 5-аминолевулиновая кислота (АЛК). При этих условиях происходило увеличение количества порфиринов в покоящихся клетках *Mtb* в 85 раз. При воздействии на эти клетки света с длинами волн 532 и 565 нм наблюдалась их инактивация. При освещении вегетативных клеток *Mtb*, персистирующих в макрофагах в течение 10 дней в присутствии АЛК около 99,99 % клеток погибали.

Таким образом, впервые было продемонстрировано успешное применение ФДИ для инактивации покоящихся клеток *Mtb* и вегетативных клеток микобактерий, находящихся в макрофагах, что обусловлено значительным накоплением эндогенных порфиринов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00324.

СЕКЦИЯ: МИКРОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВКЛЮЧАЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ ПОИСК МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ С УВЕЛИЧЕННОЙ ВЕРОЯТНОСТЬЮ НЕКРОЗА – ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ТИПА КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

*Александров А. И.¹, Гросфельд Э. В.^{1,2}, Бидюк В. А.¹, Кухтевич И. В.³, Митькевич О. В.¹,
Дмитриев С. Е.⁴, Гладышев В. Н.⁵*

¹Институт Биохимии им. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Московский Физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный

³Institute of Functional Epigenetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg D-85764, Germany

⁴Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им М. В. Ломоносова, Москва

⁵Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston MA 02115, USA

Клеточная гибель играет важную роль в развитии, старении и патологии клетки и может быть вызвана различными внешними и внутренними стимулами, например, химическими веществами или мутациями. Однако, мало что известно о хронической гибели клеток в процессе их деления. Мы провели полногеномный поиск мутантов с повышенной вероятностью гибели в делящихся пекарских дрожжах, проанализировав накопление флоксина Б, окрашивающего только мертвые клетки. Мы идентифицировали мутанты по 83 жизненно важным и 43 нежизненно важным генам с увеличенным числом мертвых клеток в популяции. В результате было обнаружено три различных типа пространственного распределения мертвых клеток в колониях дрожжей, которые соответствовали разным группам генов, связанных с (i) репликацией и репарацией ДНК, процессингом РНК, организацией хроматина и ядерного транспорта; (ii) митозом и цитокинезом и (iii) везикулярным транспортом и гликозилированием / гомеостазом клеточной стенки. Для анализа временной динамики наблюдаемой гибели клеток мы разработали методы анализа гибели новорожденных клеток (DON) и прижизненной микроскопии в реальном времени, которые выявили быстрый стохастический некроз без предварительной остановки деления. При ближайшем рассмотрении небольшого числа мутантов было обнаружено, что смерть чаще всего наступала либо во время цитокинеза, либо во время образования почек. Это указывает на то, что причина стохастической гибели клеток дрожжей связана с ремоделированием мембраны или клеточной стенки во время их деления. Это предположение отчасти подтверждается тем фактом, что большая часть флоксин-положительных мутантов оказалась чувствительной к обработке SDS, этанолом и калькофлюор белым. Поиск воздействий, снижающих эффективность гибели клеток, связанной с делением, показал, что нейтральный внешний pH, в отличие от многих других воздействий, уменьшает вероятность гибели клеток почти у всех идентифицированных мутантов. Наши результаты указывают на то, что быстрый стохастический некроз во время деления клеток является распространенным типом гибели клеток в результате дисфункции различных генов и что этот тип гибели, по-видимому, имеет некую неизвестную причину, которая может быть устранена за счет нейтрального pH снаружи клетки, и которая связана со свойствами клеточной стенки и / или плазматической мембраны.

АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНА КАК СПОСОБ АДАПТАЦИИ ДРОЖЖЕЙ К НОНСЕНС-МУТАЦИЯМ В ГЕНАХ ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Барбитов Ю. А.¹, Максютенко Е. М.^{1,2}, Москаленко С. Е.^{1,2}, Матвеев А. Г.¹,
Журавлева Г. А.¹

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет
²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

Введение. Изменения в последовательности ДНК, приводящие к появлению преждевременных стоп-кодона в рамке считывания (нонсенс-мутации), являются наиболее функционально значимой группой мутаций, ответственных за развитие многих патологий человека. Нонсенс-мутации в жизненно важных генах и у человека, и у дрожжей зачастую имеют летальный эффект. В то же время, нами были изолированы жизнеспособные нонсенс-мутанты по жизненно важным генам *SUP45* и *SUP35*, кодирующим факторы терминации трансляции eRF1 и eRF3, соответственно.

Материалы и методы. Для установления генетических механизмов адаптации дрожжей к нонсенс-мутациям в генах факторов терминации трансляции мы провели полногеномное секвенирование 100 штаммов дрожжей (полученных на основе штамма 1А-D1628), несущих различные мутантные аллели генов *SUP35* и *SUP45* (*sup35-n/sup45-n*) на центромерных плазмидных конструкциях. Также было проведено полногеномное секвенирование 13 штаммов, полученных на основе штамма 1В-D1606 и несущих мутантные аллели генов *SUP35* и *SUP45* в качестве единственной хромосомной копии (*n*-1В-D1606). Данные секвенирования выравнивали на референсный геном штаммов Петергофской генетической коллекции, после чего проводили поиск коротких генетических вариаций и анализ числа копий. Результаты анализа валидировали при помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Результаты и обсуждение. В результате секвенирования не было обнаружено частых изменений последовательности дрожжевого генома, обуславливающих адаптацию к нарушениям терминации трансляции. В то же время, мы обнаружили значительное увеличение числа копий плазмид, несущих мутантные аллели *sup35-n/sup45-n* по сравнению с аллелями дикого типа. Эти результаты были также подтверждены при помощи методики ПЦР-РВ. В четырёх из 13-ти отсекументированных штаммов *n*-1В-D1606, несущих аллели *sup35-n/sup45-n* в качестве единственной хромосомной копии, мы обнаружили дубликацию целой хромосомы II или хромосомного региона на хромосоме IV, содержащих гены *SUP45* и *SUP35*, соответственно. Помимо этого, у трёх из 13-ти штаммов были обнаружены анеуплоидии по иным хромосомам XI и XIII, не содержащим мутантные аллели соответствующих генов факторов терминации трансляции.

Заключение. Таким образом, компенсация дозы гена и амплификация мутантной аллели являются универсальным механизмом адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00050.

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРВИЧНОГО НЕКРОЗА В ДРОЖЖАХ *S. CEREVISIAE* ВНЕКЛЕТОЧНЫМ pH.

Валиахметов А. Я., Звонарев А. Н., Сузина Н. Е.

Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, info@pbcras.ru

Целью исследования являлось выявление клеточных механизмов, лежащих в основе первичного некроза у дрожжей. В связи с нарастающей проблемой микозных инфекций, вопрос индукции некроза внутри- и внеклеточными факторами приобретает особое значение. На данный момент, причиной первичного некроза считается влияние внешних физических и химических факторов (экстремальные температура, pH, осмотическое давление, токсичные вещества и т. д.). Нами показано, что первичный некроз может наступать и при отсутствии

токсических воздействий. В частности, инкубация клеток *S. cerevisiae* с глюкозой, в отсутствие других питательных веществ, приводит к быстрому развитию первичного некроза у части клеточной популяции.

Основным методом исследования был анализ динамики развития первичного некроза с использованием проточной цитометрии.

Показано, что глюкоза-индуцированный некроз (SICD) происходит в популяции клеток, находящихся в S фазе клеточного цикла. SICD оказался быстрым процессом нечувствительным к циклогексимиду, сопровождался ростом концентрации ROS и разрушением внутриклеточных структур. Обработка клеток метиловым эфиром глутатиона (проникающий в клетку скавенджер ROS) частично подавляет SICD, что указывает на первичную роль ROS в развитии некроза. Особенностью SICD оказалась его чувствительность к внешнему pH. Нейтральный pH полностью предотвращал развитие некроза. Поскольку внеклеточный pH влияет на функционирование дрожжевой клетки, мы проверили вовлеченность некоторых сигнальных путей и отдельных генов на подавление SICD нейтральным pH. Мутационный анализ показал, что *Rim101/PacC* и *PKA* сигнальные системы не вовлечены в развитие SICD (штаммы $\Delta rim21$, $\Delta ira2$). Также в этот процесс не вовлечена метакаспаза дрожжей (штамм *Lucy1*). Основные источники ROS – митохондрии и NADPH оксидаза ЭПР (*Laf1* и *Lyn1*) также не участвуют в процесс развития некроза и его подавления нейтральным pH. Делеция генов, регулирующих динамику актина ($\Delta end3$, $\Delta scp1$ и $\Delta sla1$) также не влияла на подавление некроза внешним pH. Поскольку чувствительность SICD к нейтральному pH не обусловлена функционированием ни одной из проверенных клеточных систем, мы предположили, что возможно ΔpH^+ вовлечён в этот эффект. Клетки *S. cerevisiae* при инкубации с глюкозой в течении 5 минут закисляют среду до pH 3,5. Это создаёт большой ΔpH на плазматической мембране, которого нет при инкубации клеток при pH 7. Разрушение ΔpH протонофором DNP (0,5 мМ) привело к 80 % подавлению SICD и генерации ROS. Роль второго компонента мембранного потенциала – $\Delta \Psi$ – была проверена в опытах с экзогенным KCl. Эксперименты с мембранным зондом DiOC2(3) показали, что SICD и рост $\Delta \Psi$ эффективно подавляется 150 мМ KCl. При этом ΔpH не уменьшается, а даже увеличивается. Суммируя полученные данные, мы можем констатировать, что SICD подавляется 1) при разрушении ΔpH нейтральным pH или обработкой DNP и 2) при диссипации $\Delta \Psi$ в присутствии 150 мМ внеклеточного KCl. Таким образом мы предполагаем, что ΔpH^+ на плазматической мембране регулирует развитие SICD в дрожжах *S. cerevisiae*. Источник ROS пока остаётся невыясненным.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ SPYCAS9 НУКЛЕАЗ С ПОВЫШЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДНК В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Давлетшин А. И., Спасская Д. С., Тютяева В. В., Гарбуз Д. Г., Карпов Д. С.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Москва,
artem.dav7@yandex.ru

Редактирование геномов (внесение желаемых изменений в определенные локусы геномной ДНК) имеет огромное значение как для фундаментальной науки, так и для практических приложений: медицины и биотехнологии. В настоящее время наиболее простой и удобной системой редактирования геномной ДНК является система CRISPR/Cas9 (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR associated protein – CRISPR-ассоциированный белок) из *Streptococcus pyogenes*. Однако система имеет ряд недостатков, один из которых – довольно высокая неспецифичная активность нуклеазы SpyCas9. Это ограничивает ее применение в генной терапии наследственных заболеваний.

Целью нашей работы было получение новых вариантов SpyCas9, обладающих как повышенной (относительно SpyCas9 дикого типа) специфичностью, так и активностью. Для получения новых форм мы комбинировали аминокислотные замены, для которых было показано положительное влияние на специфичность редактирования ДНК. Также с помощью

метода «эволюции в пробирке» была получена мутация, повышающая активность высокоточных SryCas9 нуклеаз, но не снижающая специфичность редактирования ДНК.

Для оценки активности и специфичности вариантов SryCas9 нами была создана тест-система на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и гена-мишени *ADE2* (Phosphoribosyl aminoimidazole carboxylase), который участвует в биосинтезе аденина. В данной тест-системе активность вариантов SryCas9 оценивалась по соотношению дрожжевых колоний, окрашенных в красный цвет вследствие SryCas9-опосредуемого нокаута гена *ADE2*.

На первом этапе работ нами был получен набор из 35 вариантов белка SryCas9, из которых были выбраны несколько форм, проявляющих наибольшую активность. Полученные новые варианты белка SryCas9 продемонстрировали высокую специфичность (в 10 раз большую по сравнению с диким типом) без значительного ущерба для целевой активности редактирования ДНК. Также был получен производный вариант, обозначенный нами как НураCas9-DE-LP, активность которого оказалась сопоставимой с таковой у белка дикого типа, при значительно более высокой специфичности редактирования ДНК.

Полученные нами высокоспецифичные и высокоактивные варианты SryCas9 могут служить перспективными кандидатами для дальнейшего улучшения технологии редактирования генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07015.

H⁺-АТФаза ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ИЗ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОСИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В ГРИБАХ

Жгун А. А.¹, Думина М. В.¹, Валиахметов А. Я.², Эльдаров М. А.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К. Г. Скрыбина, Москва, office@biengi.ac.ru

²ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, г. Пушкино, 5, boronin@ibpm.pushchino.ru

H⁺-АТФаза плазматической мембраны (PMA1) – важнейший фермент дрожжей и грибов, создающий протонный трансмембранный потенциал, определяющий многочисленные процессы жизнедеятельности клетки. PMA1 из *S. cerevisiae* является одной из наиболее исследованных H⁺-АТФаз Р типа грибов, однако до сих пор остаются вопросы, связанные с ее процессингом, агрегатным состоянием, работой в составе рафтовых структур. Также остается открытым вопрос об универсальности работы PMA1, ее способности как обеспечивать работу гетерогенных для *S. cerevisiae* партнёров, так и эффективно функционировать в гетерологичных системах. В этой связи цель нашей работы связана с дальнейшим расширением знаний о PMA1 из *S. cerevisiae*, начиная с изучения ее топологии, заканчивая возможностью использования в качестве инструмента для изучения синтеза бета-лактамов у мицелиального гриба *Acremonium chrysogenum*.

Для этого создали серию рекомбинантных штаммов на базе клеток *S. cerevisiae* и *A. chrysogenum*, несущие различные варианты кассет для экспрессии PMA1 из *S. cerevisiae* и *cefT* из *A. chrysogenum*, слитые с циановыми или желтыми флуоресцентными белками. CefT, MFS-транспортер бета-лактамовых антибиотиков, для своей работы использует трансмембранный потенциал ионов водорода, создаваемый PMA1. Показали функциональную активность CefT в клетках *S. cerevisiae* и изучили колаколизацию CefT-CFP и PMA1-YFP (при глюкозной инактивации транскрипции с хромосомной копии PMA). Также у *S. cerevisiae* в системе, где транскрипцию PMA1 с хромосомной копии переключали на индуцибельную транскрипцию с одновременно двух типов плазмидных копий PMA1-CFP и PMA1-YFP исследовали образование рафтов, несущих PMA1-CFP, PMA1-YFP или смешанного типа.

В результате гетерологичной экспрессии PMA1-YFP в клетках высокоактивного улучшенного продуцента цефалоспорина С (*A. chrysogenum* HY) удалось повысить PMA-активность до уровня, наблюдаемого в штамме дикого типа (*A. chrysogenum* WT). Также получили набор

рекомбинатов с промежуточными между штаммами WT и HY PMA-активностями. В результате удалось получить корреляцию между PMA-активностью клетки, содержанием АТФ и уровнем продукции цефемов [Zhgun A.A., PLoS One, 2020, 15 (8), e0238452]. Таким образом, PMA1 из *S. cerevisiae* может служить удобным инструментом для изучения этапов биосинтеза вторичных метаболитов в грибах.

РОЛЬ ГЛЮКАН-РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО БЕЛКА BGL2P В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ

Калебина Т. С. *, Рекстина В. В., Горковский А. А., Кудряшова И. Б.

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии,
Москва

*kalebina@gmail.com

Введение. Клеточная стенка (КС) дрожжей участвует во всем комплексе взаимоотношений клетки с окружающей средой, в том числе в реакциях на стресс. Перестройками в молекулярном ансамбле КС сопровождаются рост, деление клетки, старение и апоптоз. Ранее нами было показано, что в КС дрожжей присутствуют белки со свойствами амилоидов. КС является зоной контакта дрожжей, в том числе патогенных, с клетками высших эукариот. Такие контакты могут приводить к возникновению и развитию микозов или, в случае пищевых дрожжей, амилоидозов, индуцированных белками КС при их поступлении в организм животных и человека с кормами и пищевыми добавками. Выдвинута гипотеза о важной роли белков, обладающих амилоидными свойствами, как для формирования и функционирования молекулярного ансамбля КС дрожжей, так и в развитии амилоидозов высших эукариот. Целью работы является проверка данной гипотезы и изучение принципов формирования и функционирования КС дрожжей в норме и при стрессе. Перечисленные вопросы актуальны для исследований в области фундаментальной молекулярной биологии, а также в практической области.

Материалы и методы. Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 Mat α *his3 Δ 1;leu2 Δ 0;lys2 Δ 0;ura3 Δ 0* и *his3 Δ 1;leu2 Δ 0;lys2 Δ 0;ura3 Δ 0;bgl2::LEU2*. Использованы методы ДНК-технологий, электрофоретический и иммунологический анализ, LC-MS/MS-анализ, флуоресцентная и электронная микроскопия, флуоресцентная и КД-спектроскопия.

Результаты и обсуждение. Показано, что глюкан-ремоделирующий белок Bgl2p, выделенный из КС различных видов дрожжей обладает амилоидными свойствами. Изучение устойчивости клеток дрожжей, лишённых Bgl2p, к высушиванию и нагреву показало ухудшение их роста по сравнению с клетками, в которых Bgl2p присутствовал, что свидетельствует о важности этого белка для защиты при данных видах стресса. Выявлено три пула молекул Bgl2p, характеризующихся различной прочностью закрепления в КС и различными посттрансляционными модификациями (ПТМ). Предполагается, что ПТМ Bgl2p и некоторых других глюкан-ремоделирующих ферментов, в совокупности со способом их закрепления и локализацией в КС, могут служить ключом к пониманию регуляции их функциональной активности. На основании полученных результатов и данных, опубликованных в литературе, предложена схема увеличения площади КС дрожжей в процессе роста их клеток, по способу «панциря черепахи». Индукция фибриллообразования инсулина *in vitro* и амилоидоза у мышей *in vivo* при контакте с КС дрожжей, содержащими Bgl2p, указывает роль Bgl2p в этом процессе.

Заключение. Полученные результаты подтверждают правильность высказанной гипотезы и открывают новые пути в изучении фундаментальных принципов молекулярной организации КС дрожжей в норме и при стрессе.

УДИВИТЕЛЬНЫЕ ПРИКЛЮЧЕНИЯ ТРЕТЬЕГО ФАКТОРА ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ В МИТОХОНДРИЯХ ДРОЖЖЕЙ

Каменский П. А. *, Чичерин И. В., Левицкий С. А., Балева М. В.

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
*peter@protein.bio.msu.ru

Биосинтез белка в митохондриях организован по бактериальному типу, однако отличается от трансляции у бактерий по целому ряду параметров и свойств, в частности, по набору белковых факторов данного процесса. Самые существенные различия характерны для инициации трансляции. Так, в дрожжевых митохондриях присутствует уникальная группа факторов биосинтеза белка, называемых трансляционными активаторами. Каждый такой активатор связывается с нетранслируемыми областями (UTR) одной конкретной митохондриальной мРНК, и это связывание абсолютно необходимо для трансляции последней. Что касается канонических факторов инициации, то в митохондриях дрожжей долгое время не могли обнаружить ортолога третьего бактериального фактора (IF3). Он был биоинформатически и экспериментально идентифицирован в 2012 году; им оказался белок Aim23p. Однако функциональная роль данного белка, как оказалось, существенно отличается от роли бактериального IF3. Если у бактерий трансляция без IF3 невозможна, то в дрожжевых митохондриях биосинтез белка в отсутствие Aim23p имеет место, хотя и сильно разбалансирован с точки зрения скорости синтеза индивидуальных белков. Такое действие Aim23p до некоторой степени схоже с действием трансляционных активаторов. В данной работе мы проверили, обладает ли Aim23p активаторными свойствами в отношении мРНК COX2, трансляция которой существенно ослабляется в его отсутствие. Оказалось, что Aim23p не способен связываться с UTR мРНК COX2, однако взаимодействует с единственным описанным активатором данной мРНК, белком Pet111p. Более того, это взаимодействие существенно усиливает связывание самого Pet111p с UTR мРНК COX2. В отсутствие Aim23p мРНК COX2 практически не транслируется, однако повышенные количества Pet111p возвращают биосинтез белка Cox2p в норму. Таким образом, Aim23p является фактором, необходимым для привлечения белка Pet111p к мРНК COX2 и последующей ее активации. Мы предполагаем, что такие же специфические эффекты Aim23p оказывает и на трансляцию других митохондриальных мРНК, способствуя связыванию с ними соответствующих активаторов и являясь «организационным центром» системы активаторов трансляции. По всей вероятности, функции Aim23p в дрожжевых митохондриях далеки от канонических функций третьего фактора инициации биосинтеза белка.

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ДРОЖЖЕЙ К СТРЕССОВЫМ УСЛОВИЯМ С УЧАСТИЕМ ПРОТЕАСОМЫ И ЕЕ ГЛАВНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА RPN4

Карпов Д. С., Спасская Д. С., Тютяева В. В., Карпов В. Л.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Москва
aleom@yandex.ru

Протеасома — мультисубъединичный, АТФ-зависимый протеазный комплекс — ключевой компонент систем внутриклеточного протеолиза, участвующий в контроле всех базовых функций клеток путем селективного расщепления регуляторных белков и белков с нарушенной структурой. Дрожжевой транскрипционный фактор Rpn4 регулирует экспрессию протеасомных генов по механизму отрицательной обратной связи, т. е. является также и субстратом протеасомы. Нарушение функции Rpn4 влечет чувствительность дрожжей к различным видам протео- и генотоксичных стрессовых факторов. Нами и другими авторами показано, что мутантные штаммы дрожжей с делецией гена *RPN4* транскрипционного регулятора чувствительны к различным видам стресса, включая ДНК-повреждающие соединения, тогда как

мутантные штаммы, имеющие интактный ген *RPN4*, но с нарушенной Rpn4-зависимой регуляцией транскрипции ключевых протеасомных генов гиперустойчивы к ДНК-повреждающим факторам.

Цель работы стало выяснение Rpn4-зависимых молекулярных механизмов, лежащих в основе гиперустойчивости к ДНК-повреждающим соединениям у мутантных штаммов с нарушенной функцией протеасомы.

Установлено, что нарушение Rpn4-зависимой регуляции ключевых протеасомных генов влечет снижение активности протеасомы, что вызывает стабилизацию Rpn4. Повышение содержания Rpn4 ведет к активации экспрессии его генов-мишеней. Среди этих мишеней нами выявлены несколько генов, вовлеченных в ответ на окислительный стресс (*TRX2*), а также трех путей репарации ДНК обеспечивающих выщепление поврежденных оснований (*MAG1*), нуклеотидов (*RAD23*) и гомологичной рекомбинации (*RAD52*). В свою очередь, сверхэкспрессия *RAD52* вызывает повышение активности гомологичной рекомбинации. Показано, что нарушение Rpn4-зависимой регуляции одновременно генов *MAG1* и *RAD23* или одного гена *RAD52* достаточно, чтобы повысить чувствительность дрожжей к ДНК-повреждающим соединениям. Делеция *TRX2*, а также подавление экспрессии *RAD52* с помощью технологий редактирования генома или при использовании ингибитора дигидрокумарина возвращает чувствительность протеасомных мутантов к ДНК-повреждающим соединениям. Таким образом, показано, что сверхэкспрессия Rpn4-зависимых генов ответ на окислительный стресс и репарацию ДНК лежит в основе фенотипа сверхустойчивости к ДНК-повреждающему стрессу у штаммов с нарушенной функцией протеасомы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07021.

ЗАМЕНА β Q263L В АТФ-СИНТАЗЕ ДРОЖЖЕЙ ОСЛАБЛЯЕТ АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА И УЛУЧШАЕТ РОСТ КЛЕТОК БЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Лапашина А. С.^{1,2*}, Кашко Н. Д.^{1,2}, Зубарева В. М.^{1,2}, Галкина К. В.^{1,2}, Маркова О. В.¹,
Кнорре Д. А.^{1,2}, Фенюк Б. А.^{1,2}

¹ НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского, МГУ им. М. В.Ломоносова, Москва

² Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В.Ломоносова, Москва

* lapashina@belozersky.msu.ru,

АТФ-синтаза (F_0F_1) катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет протон-движущей силы на внутренней мембране митохондрий. При снижении этой силы (например, при гипоксии) фермент может работать в обратном направлении и АТФ-зависимо генерировать ее самостоятельно. АТФазная активность всех изученных F_0F_1 неконкурентно ингибируется комплексом MgАДФ (АДФ-ингибирование), однако свойства этого ингибирования неодинаковы у ферментов из разных организмов. Ранее мы показали, что у бактерий эти свойства в заметной степени определяются единичным аминокислотным остатком субъединицы β (β 249 у *Escherichia coli*, β 259 у *Bacillus subtilis*), и предположили, что остаток глутамина в этой позиции соответствует выраженному АДФ-ингибированию, а остаток лейцина — более слабому. Целью настоящей работы было распространить эту закономерность на митохондриальные F_0F_1 , которые в упомянутой позиции (у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* это β 263) содержат глутамин.

Мы получили штамм *S. cerevisiae* с заменой β Q263L в F_0F_1 -комплексе и сравнили свойства мутантного F_0F_1 с ферментом дикого типа на пермеабелизованных митохондриях и субмитохондриальных частицах. АТФазная активность образцов с мутацией хуже подавлялась АДФ и была менее чувствительна к азиду (блокирует АДФ-ингибированный фермент) и LDAO (препятствует АДФ-ингибированию и стимулирует гидролиз АТФ), т. е. замена β Q263L ослабила АДФ-ингибирование.

Скорость роста дрожжей с мутацией Q263L была ниже, чем у родительского штамма. Однако в случае *rho0* дрожжей (без митохондриальной ДНК) штамм β Q263L рос быстрее,

чем контрольный. Мы считаем, что клетки без мтДНК используют АТФазную активность F_1 в митохондриальном матриксе для поддержания протон-движущей силы на мембране за счет АТФ/АДФ-антипортера, и поэтому замена β Q263L, ослабляющая АДФ-ингибирование этой активности, оказывается для них полезной.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 20-14-00268).

ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МОЛОЧНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS*: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ

Лютова Л. В.^{1,2}, Наумов Г. И.¹, Наумова Е. С.¹

¹«Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт», Москва

²МГУ им. М. В. Ломоносова,
кафедра микологии и альгологии, Москва

Молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* являются вторым, после *Saccharomyces cerevisiae*, модельным объектом фундаментальных и прикладных исследований. Они имеют большое биотехнологическое значение для производства различных гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, а благодаря наличию фермента β -галактозидазы используется для производства различных молочных продуктов, а также для утилизации отходов молочной промышленности (van Ooyen et al. 2006; Panesar et al. 2010; Sampaio et al. 2020). Несмотря на большую практическую значимость все исследования проводились только на одном штамме NRRL Y-1140, выделенным из сливок в США. Вид *K. lactis* включает две разновидности: культурные молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не сбраживающие лактозу природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilum* (Sidenberg & Lachance 2006; Naumova et al. 2004).

Цель исследования – молекулярно-генетическое изучение внутривидового разнообразия дрожжей *K. lactis*. С помощью гибридологического анализа, молекулярного кариотипирования и мультигенного филогенетического анализа изучено генетическое родство 69 штаммов, выделенных из молочных продуктов и различных природных источников (сокотечения деревьев, насекомые, почва и др.) в странах Европы, включая Россию, Таджикистане, США, Канаде, Китае и Японии.

Мультигенный филогенетический анализ разделил изученные штаммы на три кластера. Внутри первого кластера выделяются две группы штаммов. В первую группу вошли молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не сбраживающие лактозу европейские и среднеазиатские штаммы, имеющие идентичные ITS1/ITS2-последовательности и сходные молекулярные кариотипы. Во второй группе объединены североамериканские изоляты *K. lactis* var. *drosophilum*, значительно различающиеся по молекулярным кариотипам от штаммов первой группы и образующие с ними полустерильные гибриды: 13–45 % выживаемости аскоспор. Второй кластер образован изолированными в Дальневосточной Азии природными штаммами, ITS-последовательности которых отличаются от остальных штаммов *K. lactis* по 5–10 нуклеотидным заменам. В третьем кластере объединены изолированные из болот в США штаммы *K. lactis* var. *drosophilum*, отличия по ITS-последовательностям которых составили 6–10 замен. Штаммы этих кластеров обладают уникальными кариотипическими профилями и частично генетически изолированы друг от друга и от штаммов первого кластера: выживаемость гибридных аскоспор не превышала 13%.

Согласно полученным результатам, вид *K. lactis* имеет сложный состав и включает наряду с культурными молочными дрожжами *K. lactis* var. *lactis* частично генетически изолированные природные экологические и географические популяции.

Исследование поддержано российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002 МНТ_а).

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Рогов А. Г.^{1*}, Голева Т. Н.¹, Епремян Х. Х.¹, Киреев И. И.², Звягильская Р. А.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, info@fbras.ru.

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, fxb@genebee.msu.su.

*lloss@rambler.ru

Митохондрии, помимо общеизвестной роли в энергозапасании, выполняют и другие жизненно важные функции в клетке. Они глубоко интегрированы в общий клеточный обмен, играют основную роль в таких глобальных процессах, как проведение клеточных сигналов, в системе выбора клетки между жизнью и смертью, являются основными источниками активных форм кислорода в клетке. Дисфункция митохондрий приводит к старению и многочисленным патологиям. Митохондрии, в отличие от других органелл, постоянно меняют свои размеры и форму, подвергаясь непрерывному процессу слияния и фрагментации. Динамика митохондрий играет важную роль в восстановлении функций поврежденных органелл путем их смешивания с интактными органеллами. В последнее время появляется все больше исследований, связывающих нейродегенеративные и другие заболевания с дисфункцией митохондрий, а именно, с нарушением их динамики и зависимым от митохондрий окислительным стрессом.

Цель работы заключалась в моделировании и прослеживании процесса развития окислительного стресса в клетках дрожжей.

В качестве объекта исследования использовали дрожжи *Dipodascus magnusii*, гигантские клетки, содержащие в норме разветвленный митохондриальный ретикулум, что делает их идеальной моделью для такого рода исследований. Окислительный стресс индуцировали добавлением прооксиданта *tert*-бутилгидропероксида (*t*-ВНР). Окислительный стресс детектировали методами флуоресцентной микроскопии, Time-lapse микроскопии и проточной цитометрии.

Показано, что воздействие прооксиданта *t*-ВНР приводило сначала к появлению активных форм кислорода в митохондриях, а затем, спустя определенный лаг-период, к генерализации окислительного стресса по всей дрожжевой клетке. Предварительная инкубация дрожжей с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 снижала уровень окислительного стресса в клетках, но не отдаляла начало его распространения во времени. Митохондриальный ретикулум дрожжей под действием окислительного стресса подвергался фрагментации, которая всегда предшествовала генерализованному окислительному стрессу.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых-кандидатов наук МК-1260.2020.4.

РОЛЬ ТРАНСПОРТА СТЕРИНОВ В ЗАЩИТЕ ОТ СТРЕССА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Соколов С. С., Галкина К. В., Северин Ф. Ф., Кнорре Д. А.

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва, sviatoslav.sokolov@gmail.com

Основной стерин дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* эргостерин синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), откуда транспортируются в другие клеточные мембраны, в том числе в плазматическую мембрану (ПМ), в которой содержится до 90 % клеточных стерин. Скорость транспорта стерин между ЭР и ПМ высока, она более чем в 10 раз превышает расчетную величину скорости пополнения стеринового пула ПМ, необходимую для пролиферации. Транспорт стерин происходит не везикулярно и осуществляется белками семейств Osh и Lam. Белки Osh имеют цитоплазматическую локализацию и способны

транспортировать стерины против градиента концентрации, обменивая их на фосфатидилинозитол-4-фосфат. Белки Lam C-концом заякорены в ЭР и, по-видимому, обменивают стерины по градиенту концентрации. Белки Lam1-Lam4 локализованы в местах контакта ЭР с плазматической мембраной (ПМ). Функции Osh и Lam белков сильно вырождены, сильное фенотипическое проявления имеет только одновременное нарушение многих генов. Мы исследовали фенотипические нарушения LAM генов и показали, что в большинстве стрессовых условий: высушивание, замораживание, тепловой стресс, добавление Амфотерицина В, этанола, изопропанола, высоких концентраций NaCl фенотипические проявления lam мутаций схожи: изменяется чувствительность к стрессам тем сильнее, чем больше генов нарушено. При этом основной вклад вносит нарушение гена LAM2. В то же время делеция генов семейства LAM приводило к увеличению резистентности дрожжей к азольным антимикотикам. Мы обсуждаем вклад транспорта стерина между ПМ и ЭР в развитие устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №18-14-00151.

ПОСТЕРНАЯ СЕССИЯ

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИИ-ХИЩНИКА *LYSOBACTER SP. LBI* С БАКТЕРИЯМИ-ЖЕРТВАМИ ПО ТИПУ «WOLF PARK» («ВОЛЧЬЯ СТАЯ»)

Абашина Т. Н., Шорохова А. П., Соболева О. И., Мачулин А. В.,
Поливцева В. Н., Сузина Н. Е.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино,
e-mail: admin@ibpm.ru

Введение. Проведенные комплексные цитологические исследования посвящены изучению фундаментальных принципов, лежащих в основе межбактериального паразитизма в естественной среде обитания. Актуальность исследования обусловлена важностью развития представлений о функционировании микробных экосистем. Результаты исследования имеют особенное значение для решения проблемы резистентности возбудителей инфекций к антибиотикам.

Материалы и методы. Исследования осуществляли в динамике взаимодействия бактерии-хищника *Lysobacter sp. LBI* и бактерий-жертв из коллекции авторов исследования. Антибактериальную активность *Lysobacter sp. LBI* детектировали по образованию зон лизиса в культурах-тест объектов диско-диффузионным методом. В качестве тест-культур было использовано 22 штамма грамположительных и грамотрицательных бактерий представителей таких родов, как *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Erwinia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Deinococcus* и *Achromobacter* из рабочей лабораторной коллекции авторов.

Микроскопические наблюдения в фазовом контрасте, включая наблюдение с применением видеофиксации, проводили с использованием микроскопов Nikon Eclipse Ci microscope (Nikon, Япония) с камерой ProgRes SpeedXT (Jenoptic, Германия). Комплексные электронно-микроскопические цитологические исследования осуществляли с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждения. Показано, что штамм *Lysobacter sp. LBI* проявлял высокую антимикробную активность в отношении широкого спектра, как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Детально охарактеризована морфология и ультраструктурная организация клеток *Lysobacter sp. LBI* в динамике взаимодействия с клетками жертвы. Показано, что секреция везикул наружной мембраны (ВНМ) у *Lysobacter sp. LBI* является индуцибельным процессом и инициируется в присутствии бактерии-жертвы в лимитированных средах. Процесс завершается массовым лизисом бактерий-жертв и впоследствии спор для спорообразующих бактерий.

Заключение. Основываясь на полученных результатах, предложен ранее не известный ультраструктурный механизм атаки клеток *Lysobacter sp. LBI* по типу «wolf park» («волчья стая»). Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00132 А.

СРАВНЕНИЕ ГЕНОВ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК PrrF У ПСЕВДОМОНАД

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

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

Введение. PrrF-малая некодирующая РНК_α, участвующая в регуляции экспрессии генов в условиях дефицита железа у *P.aeruginosa* PAO1. В геноме PAO1 расположены 2 копии гена prrF, идентичных друг другу на 95 % и расположенных тандемно. Каждый из генов имеет соб-

ственный промотор, сайт связывания транскрипционного фактора Fur и Rho-независимый терминатор. У других видов микроорганизмов рода *Pseudomonas* PrrF не изучена.

Материалы и методы. В работе использовали геномы псевдомонад видов: *aeruginosa* (PAO1, NCTC10332, PAC1, Carb01 63, Pa1207), *oleovorans* (T9AD), *pseudoalcaligenes* (CECT5344), *putida* (BS3701, NBRC 14164, KT2440, JBC17, B1), *fluorescens* (NCTC10038, FW300-N2C3, KF1, SIK_W1, JNU01, SBW25), *syringae* (BIM B-268, Susan762, CAS02, inb918, U643). Последовательности prrF выравнивали с помощью алгоритма ClustalW. Модель вторичной структуры строили с помощью сервера RNAfold.

Результаты и их обсуждение. В исследуемых геномах встречается преимущественно по 2 копии prrF: у видов *aeruginosa* и *oleovorans* гены расположены тандемно, у видов *putida*, *fluorescens*, *syringae* расположено на значительном расстоянии друг от друга. У двух штаммов, *P. aeruginosa* Pa1207 и *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, обнаружили только по 1 копии prrF. У всех проанализированных генов был сайт связывания Fur и Rho-независимый терминатор. RNAfold предсказал у PrrF наличие 4х шпилек: последовательность UCGCGAG, которая консервативна у всех исследованных PrrF, предположительно является петлей шпильки 2 (функция неизвестна), последовательность UAUCUCCUCAUCAGGCUAAU входит в состав короткого участка стебля шпильки 3 и формирует шпильку 4 (часть нуклеотидов ответственная за связывание с РНК-шапероном Hfq, функция других неизвестна).

Заключение. Расположение 2х копий гена prrF отличается от описанного для *P. aeruginosa* PAO1, а в ряде случаев вообще обнаружена лишь 1 копия гена. Множественное выравнивание позволило обнаружить консервативные нуклеотидные последовательности, функции которых не были исследованы.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЗИСТОМА МИКРООРГАНИЗМОВ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Адельгареева А. Ю., Маркушева Т. В.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Уфа, ib@anrb.ru

Наблюдаемая в настоящее время тенденция изменения в микробных популяциях пула генов резистентности к антибиотикам обуславливает высокую актуальность скрининга резистомов различных экосистем, включая техногенные.

Целью настоящего исследования являлось изучение генетических детерминант резистентности к антибиотикам микроорганизмов промышленных экотопов Республики Башкортостан.

В качестве объектов были выбраны вновь выделенные из почвенных сообществ Северного и Южного промузлов РБ представители нескольких родов бактерий, а именно: *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*.

Поиск целевых генов осуществляли с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). При скрининге кодирующего резистентность к тетрациклину гена *tetM* применялся набор Резистом *tetM* (НПФ «Литех», г. Москва). Для обнаружения генов устойчивости к хлорамфениколу *catA1* использовали праймеры, подобранные из ресурсов NCBI. ПЦР проводили на термоциклере TC 2720 (Applied biosystems, США). Заключение о наличии генов *tetM* и *catA1* делали в случаях образования целевых амплификатов, устанавливаемых по маркеру длин молекул ДНК в диапазоне от 100 п. н. до 1000 п. н.

В результате ПЦР-детекции у одного из изолятов рода *Bacillus* была обнаружена последовательность, подобная последовательности гена *tetM*. Вместе с тем молекулярно-генетический анализ гена *catA1* показал отсутствие подобных гену *catA1* последовательностей у всех исследуемых культур.

Полученные результаты способствуют пониманию особенностей строения геномов бактерий современной техносферы и могут быть востребованы в разработках алгоритмов мониторинга антибиотикорезистентности антропогенной среды.

СРАВНЕНИЕ ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ШТАММОВ РОДА *CYANOBACTERIUM*

Александрова Е. А.^{1,2,3}, Синетова М. А.¹, Миронов К. С.¹

¹Институт физиологии растений им. А. К. Тимирязева РАН, Москва, ifr@ippras.ru

²МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Цианобактерии – древняя группа организмов, приспособившаяся среди прочего к условиям соленых и содовых озер. Они являются удобным модельным объектом для изучения механизмов адаптации всех фотосинтезирующих организмов.

Целью работы было сравнить экофизиологические и генетические характеристики штаммов одноклеточных цианобактерий *Cyanobacterium stanieri* IPPAS B-1200 и IPPA B-2031 и *C. aponinum* IPPAS B-1201.

Для выявления оптимальных значений pH, а также оптимальных концентраций NaCl и NaHCO₃ штаммы выращивали на средах различного состава. pH изменяли от 6 до 11, концентрации бикарбоната и хлорида натрия от 0 до 2 М. Последовательности генов, кодирующих белки, которые отвечают за адаптацию к подобным изменениям условий, искали в отсекуированных геномах при помощи алгоритма BlastP и веб-сервиса OrthoVenn2. При сравнении были использованы также геномы *C. stanieri* PCC 7202 и *C. aponinum* PCC 10605.

Было показано, что штаммы *C. stanieri* предпочитают условия с повышенным содержанием NaCl и NaHCO₃ и pH = 9–10, а *C. aponinum* лучше всего растет при pH от 8 до 9, добавлении 0,5 М NaCl и отсутствии NaHCO₃.

При высоких концентрациях бикарбонат-иона наиболее полезен переносчик BicA, имеющий высокую пропускную способность. Он найден в двух экземплярах у всех исследованных штаммов, кроме B-1201, имеющего только одну копию. Высокоаффинная система транспорта бикарбоната SbtAB представлена у пресноводных термофильных штаммов (группа *C. aponinum*), и отсутствует у B-2031 и PCC 7202.

Обнаружено дублирование Na⁺/H⁺- антипортеров NhaS3 у штаммов PCC 10605 и B-1201, а также дублирование NhaS5 у PCC 10605, B-1201, B-2031. Эти переносчики ответственны за кратковременную акклимацию к повышению концентрации NaCl, что соответствует условиям обитания изучаемых штаммов.

Все штаммы имеют гены ферментов GgpS и GgpP, ответственных за синтез осмопротектора глюкозилглицерина, что характеризует эти организмы как умеренных галотолерантов.

Таким образом, предсказаны возможные механизмы генетической адаптации близкородственных организмов к различным условиям среды.

Работа выполнена на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR-CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДЛЯ УСИЛЕНИЯ СИНТЕЗА АЦЕТИЛ-CoA И МАЛОНИЛ-CoA В ДРОЖЖАХ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Андреева Н. И.¹, Дементьев Д.А.¹, Юзбашева Е. Ю.²

¹«Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, vkpm@genetika.ru

²БиоКай Инк, США, Калифорния, Фримонт.

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* могут служить устойчивым продуцентом липидов и их производных. Стартовыми молекулами пути синтеза липидов в *Y. lipolytica* являются ацетил-CoA и малонил-CoA. Пул ацетил-CoA в цитозоле *Y. lipolytica* может быть усилен гетерологичной

экспрессией фосфокетолазы PK из грибов. Мутантная версия фермента ацетил-СоА карбоксилазы ACC1, ответственного за формирование малонил-СоА, обладает повышенной активностью. CRISPR-Cas9 система редактирования генома успешно применяется для инженерии *Y. lipolytica*. Целью данной работы было усиление синтеза ацетил-СоА и малонил-СоА путём внедрения генов PK *Aspergillus niger* и *A. nidulans* совместно с геном фосфотрансацетилазы *Escherichia coli (pta)*, и интеграция мутантного варианта *Y. lipolytica ACC1 mut* при помощи системы CRISPR-Cas9.

В работе использовали совместимый с CRISPR-Cas9 штамм ВКПМ Y-4967. Для интеграции целевых генов проводили ко-трансформацию кассетой, несущей данные гены, и эписомальным вектором, содержащим нуклеотидные последовательности гена *Cas9* и направляющей РНК (sgRNA). Для оценки эффективности модификаций определяли общее содержание жирных кислот в сухой биомассе образцов методом ГХ МС.

В результате были получены штаммы Y-4967-Anig №3, несущий ген PK *A. niger* совместно с *pta*, Y-4967-Anid №1, несущий ген PK *A. nidulans* совместно с *pta*, и Y-4967-ACC1m №5, несущий *ACC1 mut*. Анализ показал, что, по сравнению с Y-4967, общее содержание жирных кислот повысилось на 1,1 % для Y-4967-Anig №3, на 10,4 % для Y-4967-Anid №1 и на 32,5 % для Y-4967-ACC1m №5. Все модификации, внесённые в штамм Y-4967 при помощи системы CRISPR-Cas9, привели к повышению накопления липидов по сравнению с исходным штаммом, что говорит об усилении на их фоне синтеза ацетил-СоА и малонил-СоА. Наилучшим образом на накопление липидов в Y-4967 повлияла интеграция в его геном мутантного *ACC1 mut* и гетерологичная экспрессия PK *A. nidulans*.

ЦИАНОБАКТЕРИИ ЭПИЛИТОНА ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ БУХТЫ КАРАНТИННАЯ (ЧЕРНОЕ МОРЕ, СЕВАСТОПОЛЬ)

Андреева Н. А.

Институт природно-технических систем, Севастополь, andreeva.54@list.ru

Цианобактерии (Cyanoprokaryota) являются неотъемлемым компонентом альгоценозов морских обрастаний как искусственных, так и естественных субстратов (например, камней). Оброст камней (эпилитон), судя по литературным данным, изучен слабо, а упоминания цианобактерий в этой связи вообще единичны. Хотя, наряду с фитопланктонными и фитобентосными формами они могут служить надёжными индикаторами экологического состояния среды.

Исследования состава цианобактерий естественного обрастания на камнях, взятых в зоне прибрежного мелководья Карантинной бухты, проводились в течение 2017–2020 гг. Каждый раз анализировались три образца, отобранные примерно на расстоянии 100 м друг от друга. Оброст, в виде плотного налета, с поверхности камней снимали при помощи скальпеля. Всего было исследовано 99 образцов. Морфологию цианобактерий изучали как на препаратах из нативного материала, так и после культивирования соскобов в течение 30–120 суток на жидкой модифицированной среде Громова № 6 (приготовленной на морской воде). При микроскопировании использовался световой микроскоп при увеличении $\times 400$. Фотографирование культур проводилось при помощи цифровой насадки биологического микроскопа Levenhuk 740T с применением компьютерной программы Levenhuk TourView и дальнейшей обработкой изображений в программе Adobe Photoshop CS3 Extended.

Исследования, проводимые в течение четырех лет, показали, что цианобактерии, наряду с диатомовыми водорослями, являлись основными обрастателями камней в прибрежной зоне Карантинной бухты. Таксономический состав цианобактерий эпилитона представлен более, чем 10-ю различными формами, включающими рода: *Microcystis*, *Chroococcus*, *Lep- tolyngbya*, *Merismopedia*, *Pleurocapsa*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Chaemosiphon*, несколькими родами порядка Oscillatoriales (в том числе *Spirulina*) и неидентифицированными Cyanoprokaryota. Самыми распространенными оказались представители рода *Pleurocapsa* и нескольких родов порядка Oscillatoriales. Их встречаемость в эпилитоне за период исследования составляла 100%. Важными факторами, влияющими на состав и биоразнообразие любого морского

фитосообщества являются сезонные колебания температуры и уровня солнечной радиации. Как показали наши исследования, наименьшее количество форм цианобактерий в эпилитоне (в среднем 2 единицы) наблюдалось во время весеннего сезона, а наибольшее (по 8 единиц) в летний и осенний периоды, когда температура воды достигала 22–24°C. В то же время, выявлено изменение разнообразия представителей различных родов по годам. Наибольшее количество форм цианобактерий обнаруживалось в эпилитоне в течение 2018 и 2020 гг. (6 и 8 единиц соответственно). В 2018 году, помимо *Pleurocapsa* и осцилляториевых, здесь присутствовали *Microcystis*, *Merismopedia*, *Spirulina*, *Nostoc* и *Calothrix*, а в 2020 вместо *Merismopedia* и *Nostoc* отмечались *Leptolyngbya*, *Chaemosiphon* и неидентифицированные формы.

Таким образом, показано, что основными представителями эпилитона в севавтопольских бухтах Черного моря наряду с диатомовыми водорослями являются цианобактерии. Таксономический состав цианобактерий эпилитона представлен более, чем 10-ю различными формами. Отмечена межгодовая изменчивость их родового состава.

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В КЛЕТКЕ ВО ВРЕМЯ ИНФЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГОМ ρ hiKZ

Антонова Д. А., Ничипоренко А. С., Усатых А. А., Якунина М. В.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, ИБСиБ,
научно-исследовательский комплекс «Нанобиотехнологии»,
Санкт-Петербург nasada12@mail.ru

При изучении процесса инфекции клеток бактериофагами внимание исследователей приковано к процессам созревания фаговых частиц, оставляя изменения в бактериальной клетке без внимания. В то же время в клетках происходят масштабные изменения: в клетке *Pseudomonas aeruginosa* после инфекции бактериофагом ρ hiKZ уже на пятой минуте инфекции происходит смещение нуклеоида к полюсу, противоположному месту впрыскивания фаговой ДНК. При этом, как минимум до 40 минуты инфекции ДНК бактерии не подвергается полной деградации [1], что поднимает вопрос о компактизации бактериального нуклеоида, смещенного на этом этапе инфекции к мембране клетки. Процессы, лежащие в основе таких масштабных перестроек интересны и с практической точки зрения, т.к. белки, участвующие в перестройках бактериального генома, могут послужить мишенью для новых антимикробных препаратов.

Целью нашей работы являлось изучение местоположения белка голодания DpsI и бактериальной гиразы в клетке во время инфекции и определения возможности использования данных белков в исследованиях перераспределения нуклеоида в клетке. Гены, кодирующие DpsI и субъединицу гиразы, были заклонированы к гену флуоресцентного белка mCherry для синтеза белков слияния. Далее клетки *Paeruginosa* штамма PAO1 трансформировали одной из полученных генных конструкций. Клетки растили в жидкой питательной среде с добавлением индуктора, после чего их инфицировали бактериофагом ρ hiKZ и помещали под флуоресцентный микроскоп для последующей съемки.

Субъединица гиразы в инфицированных клетках первоначально концентрировалась ближе к одному из полюсов клетки, а на более поздних стадиях инфекции располагалась под мембраной клетки. Такое описание схоже с перемещениями нуклеоида бактерии во время инфекции, поэтому мы полагаем, что гиразы прочно связана с ДНК бактерии. DpsI в инфицированных клетках образует скопления, вероятно, спровоцированные инфекцией, поскольку в неинфицированных клетках возникновение скоплений этого белка происходит намного позже, что, по-видимому, связано с истощением питательных веществ в подложке.

Вероятно, гиразы принимает участие в процессах, происходящих в бактериальном нуклеоиде. Участие DpsI в связывании бактериальной ДНК в ходе инфекции требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 19-74-10030.

БИОГЕОХИМИЧЕСКИЙ БАРЬЕР В ВЕРХНИХ ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТАХ ОАО «ЧМЗ» С УРАНОВЫМ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ

Артемьев Г. Д., Сафонов А. В., Попова Н. М.

Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва
artemyev56@gmail.com

Предприятия по добычи и переработке урана приводят к значительному загрязнению поверхностных и подземных вод ураном, анионами минеральных кислот (нитраты, сульфаты), аммонием и тяжёлыми металлами. Загрязнение подземных приводит к неконтролируемой миграции поллютантов и может привести к их попаданию в водозаборы и открытую гидросеть. Важным условием миграции урана и ряда тяжелых металлов в растворимой форме является окислительная обстановка, поддерживаемая высокими концентрациями нитрат-ионов. Одним из способов иммобилизации загрязнителей в пределах установленной зоны является *in situ* биоремедиация, осуществляемая путем стимулирования автохтонного микробного сообщества растворимыми органическими донорами электронов. В результате этого развитие микробных процессов в водоносных горизонтах может привести к удалению соединений азота в форме молекулярного азота и иммобилизации урана за счёт осаждения в биогенных минеральных осадках, содержащих, железо, кальций, магний, восстановленную серу, составляющих основу биогеохимического барьера.

Целью работы являлось изучение условий формирования биогеохимических барьеров для иммобилизации урана в верхних водоносных горизонтах с нитратным и аммонийным загрязнением в районе хвостохранилища Чепецкого Механического Завода (ЧМЗ) г Глазов.

Хвостохранилища АО «ЧМЗ» созданы более 50-ти лет назад, и на сегодняшний день частично утратили свои гидроизолирующие свойства. При анализе проб воды верхнего водоносного горизонта обнаружены нитрат-ионы до 10 г/л, аммоний до 500 мг/л, сульфат-ионы до 500 мг/л и уран до 5 мг/л. В отобранных пробах было обнаружено метаболически разнообразное микробное сообщество, способное участвовать в формировании биогеохимического барьера, восстанавливать нитрат- и сульфат-ионы и железо.

Для стимулирования микроорганизмов были подобраны органические субстраты. Наиболее эффективным при различных содержаниях нитрата оказалась смесь сахара, мелассы, молочной сыворотки и ацетата. Добавление органических субстратов привело к снижению значений eH до -200 мВ, полному удалению нитрат-ионов, восстановлению сульфатов до сульфидов, образованию гидрокарбонатов. Анализ состава биогенных осадков методами сканирующей электронной микроскопии (SEM EDX) позволил предположить возможность осаждения сульфидных минеральных фаз, в составе которых присутствовали P, S, Ca, Fe. Методом порошковой дифракции (XRD) в эксперименте с исходно низким содержанием сульфата установлено наличие минеральных фаз урана в виде мета-отенита, а после образования гидрокарбонатов, при окислении органического вещества была идентифицирована фаза биогенного кальцита.

Проведение полевых испытаний создания биогеохимического барьера *in situ* на территории ОАО «ЧМЗ» за первые 3 месяца позволило создать восстановительный барьер, значение eH перешло в восстановительную область на 5–7 сутки эксперимента и на сегодняшний день достигло значения порядка -200 мВ и существенно снизить концентрацию нитрата, в некоторых пробах в 20 раз. Анализ биогенных осадков в пластовой воде позволил обнаружить фазы с высоким содержанием железа, кальция и фосфора, являющихся важной частью биогеохимического барьера для урана.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ПОИСКА ЛИТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ *LYSOBACTER CAPSICI* ВКМ В-2533^Т

Афошин А. С., Кудрякова И. В., Тарлачков С. В., Леонтьевская (Васильева) Н. В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина,
ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушиноadm@ibp.msu.ru

В настоящее время стремительное развитие «омик»-технологий определяет как современное состояние, так и основные направления развития биологической науки. В частности, геномные и транскриптомные подходы используются при изучении механизмов взаимодействия между бактериями рода *Lysobacter* и фитопатогенными грибами. В настоящее время в ИБФМ РАН проводится активная работа по изучению литического потенциала штамма *L. capsici* ВКМ В-2533^Т: показана его активность в отношении патогенных бактерий и фитопатогенных грибов, выделено несколько бактериолитических ферментов.

Для поиска литических агентов, продуцируемых *L. capsici*, мы применили транскриптомный подход, используя живые клетки *Staphylococcus aureus* 209Р в качестве индуктора экспрессии генов литических агентов. Были разработаны оптимальные условия индукции: штаммы *L. capsici* и *S. aureus* сокультивировали на минеральной среде в течение 48 ч с последующим секвенированием РНК *L. capsici*. В качестве контроля использовалась культура *L. capsici* без внесения индуктора.

В результате было установлено, что при сокультивировании данных штаммов увеличивалась литическая активность *L. capsici* в отношении живых клеток *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Aspergillus niger*. Этот результат свидетельствует в пользу того, что удалось индуцировать литические агенты, среди которых могут быть как бактериолитические ферменты и антимикробные пептиды, так и антибиотики. Транскриптомный анализ показал, что в целом, количество генов, уменьшивших свою экспрессию при добавлении индуктора, несколько выше, чем количество генов, увеличивших экспрессию. При этом особый интерес представляют гены гидролитических ферментов, увеличившие уровень экспрессии, функциональный статус которых предстоит установить в дальнейшем. Отдельно стоит отметить увеличение экспрессии генов биогенеза четвертого пути секреции (Т4SS), усиление которых также было ранее обнаружено при взаимодействии *Lysobacter* с грибами. Это может свидетельствовать об универсальных механизмах взаимодействия *Lysobacter* с конкурентными микроорганизмами.

Дальнейшие исследования будут направлены на идентификацию, выделение и характеристику искомым литических агентов *L. capsici*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00086).

СИНЕРГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИДРОЛАЗ RpfB и RipA СТИМУЛИРУЕТ РЕАКТИВАЦИЮ «НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ» ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Багаева Д. И., Демина Г. Р., Никитушкин В. Д., Вострокнутова Г. Н., Шлеева М. О.,
Капрельянц А. С.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва info@fbras.ru.

Латентный туберкулез, являющийся следствием перехода *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) в покоящееся состояние, трудно поддается диагностике. Это связано с тем, что часто в этих случаях микобактерии становятся «некультивируемыми», т. е. теряют способность расти на стандартных лабораторных средах. Ранее было выяснено, что совместное действие белков: Rpf (resuscitation promoting factor) – пептидогликангидролазы и RipA (resuscitation promoting factor interacting protein) – эндопептидазы, приводит к стимуляции реактивации покоящихся форм (ПФ) актинобактерий *Mycobacterium smegmatis* [Nikitushkin et al.,

2016]. Целью данной работы было изучение влияния белков Rpf и RipA на реактивацию ПФ *Mycobacterium tuberculosis*.

Методы. Конструкции белков RpfB и RipA были трансформированы в *E. coli* BL21 (DE3). Выделение и очистка белков были проведены с использованием металлхелатной хроматографии. Продукты ферментативной активности (муропептиды) белков получали совместным действием RpfB и RipA на пептидогликан микобактерий. Определение концентрации муропептидов проводили фенол-сернокислотным методом. Реактивацию проводили на ПФ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (возраст культур — 6–8 месяцев), полученных путем постепенного снижения pH внешней среды [Shleeva et al., 2011]

Результаты. Добавление муропептидов, а также комбинации муропептидов и рекомбинантных белков Rpf и RipA, стимулировало реактивацию ПФ *Mtb*, сокращая лаг-фазу на 4 суток. Усиление реактивации наблюдалось в присутствии обоих белков по сравнению с арифметическим сложением эффекта каждого белка и при этом наблюдалось укорочение лаг-фазы в 1,5–2 раза. Таким образом, ранее наблюдаемый синергизм в экспериментах по деградации ПГ также наблюдался и в случае реактивации ПФ *Mtb*. Этот результат является первым экспериментальным подтверждением участия RipA в реактивации ПФ *Mtb*.

Выводы. Как сами белки, так и продукты их реакции вызывают реактивацию покоящихся форм *M. tuberculosis*.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00324.

НОВАЯ СЕРИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА PAPS ИЗ *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ВКМ-F4104D ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗОВАННЫХ КЛЕТКАМИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Байдамшина Д. Р.¹, Рафия Наср А.¹, Комаревцев С. К.²; Осмоловский А. А.³,
Каюмов А. Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, public.mail@kpfu.ru

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, vnivipat@mail.ru

³Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, info@mail.bio.msu.ru

Введение

Биопленки — сложные микробные сообщества, прикрепленные к поверхностям и окруженные матрицей внеклеточных полимерных веществ. Образование биопленок считается одним из факторов, определяющих патогенность и устойчивость бактерий к противомикробным препаратам за счет уменьшения проникновения антибиотиков. Многие условно-патогенные бактерии образуют биопленки на хронических и острых кожных ранах, препятствуя их заживлению и вызывая рецидивирующие инфекции. Предотвращение образования биопленок и разрушение уже сформировавшихся биопленок имеет решающее значение для клинического лечения инфекционных заболеваний. Ферментативный гидролиз биопленок может облегчить проникновение противомикробных препаратов в клетки и повысить эффективность противомикробного лечения.

Материалы и методы

PAPS является фибринолитической протеазой-активатором протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D. Рекомбинантная форма фермента была получена в *E. coli* BL21 (DE3), очищена на Ni-NTA-агарозе и предоставлена для работы.

Результаты и обсуждение

Обработка 48-часовых биопленок, образованных клетками *S. aureus* протеазой PAPS (100 мкг/мл) снижает биомассу наполовину как при окрашивании CV-, так и при окрашивании конго-красным. Комбинация PAPS с ванкомицином и амоксициллином увеличивала эффективность последнего в 10 раз, что оценивали с помощью МТТ-анализа, окрашивания резазурином и количеству КОЕ. Анализ Live/dead BacLight при комбинировании PAPS с антибиотиками также подтвердили предыдущие результаты.

Заключение

Сериновая протеаза PAPC является многообещающим агентом для комбинированной антибиотико-ферментативной терапии для наружного лечения инфекций, связанных с биопленкой, образованной клетками *S. aureus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ-20-16-00085 (получение белка) и РФФИ-20-04-00247 (исследование биопленок).

ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕЕЙ РОДА *THERMOCOCCUS*

Барашкова А. С.¹, Рогожин Е. А.¹, Прокофьева М. И.², Чердынцева Т. А.³,
Шегина Е. С.³, Ратникова Н. М.², Гаврилов С. Н.²

¹Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН

³Биологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова

В настоящее время, в связи с проблемой роста антибиотикорезистентности патогенов человека и животных, большое значение приобретает поиск новых антимикробных соединений. В качестве источников таких веществ особенно интересны микроорганизмы, бактерии и археи, обитающие в разнообразных экстремальных экосистемах. Стоит отметить, что, антимикробные метаболиты архей остаются слабо изученными, и ранее у них обнаруживали антагонистическую активность только против других экстремофилов. При поиске веществ с антимикробными свойствами особое внимание обращают на метаболиты, секретируемые микроорганизмами в питательную среду, что упрощает технологический процесс их выделения и характеристики. При этом, первичное тестирование, как правило, проводят на уровне культуральной жидкости (к. ж.). Выделение активных компонентов из к. ж. — отдельная задача при поиске новых антимикробных соединений, от успеха которой зависит обнаружение активной субстанции и её максимальное извлечение.

Цель нашей работы заключалась в разработке схемы выделения и первичной характеристике антимикробных соединений из к. ж. *Thermococcus* sp. 2319 1. Спектр задач включал в себя подбор схемы экстракции и фракционирования, получение активных фракций, выделение индивидуальных активных компонентов и их наработка в количествах, необходимых для дальнейших структурных и функциональных исследований. Была предложена схема разделения к. ж., в основе которой лежит разделение ее компонентов по принципу гидрофобности. Образец к.ж. после отделения биомассы наносили на колонку, заполненную гидрофобной смолой Amberlite XAD-2. Гидрофильные компоненты, не связавшиеся с сорбентом, собирали отдельно и подвергали экстракции бутанолом-1. Компоненты, связавшиеся с фазой, элюировали буфером состава ацетон:бутанол:вода, 1:1:1 (рН 3.0). Элюат и бутанольный экстракт несвязавшихся компонентов к.ж. были упарены досуха, после чего перерастворены в 2 % DMSO и протестированы на наличие антибактериальной активности по отношению к нескольким условно патогенным бактериям. Выраженная активность против *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* была обнаружена исключительно в элюате к. ж., который далее был подвергнут анализу методом аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ в системе подвижной фазы буфер А — 0,1 % трифторуксусная кислота и буфер Б — 80 % ацетонитрил в 0,1 % ТФУ, в линейном градиенте буфера Б. Чтобы оценить вероятный вклад компонентов питательной среды в активность к.ж., тем же способом был обработан образец неинокулированной питательной среды («контроль»). Сравнение хроматографических профилей к.ж. и контроля выявило 2 компонента активной фракции, являющихся уникальными для к.ж. Спектры их оптического поглощения в УФ-диапазоне по наличию характерных максимумов позволили заключить, что, по крайней мере, один из антибиотически активных продуктов биосинтеза *Thermococcus* sp. 2319 1 имеет пептидную природу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ_20-04-01142_a.

СВОБОДНОЖИВУЩИЕ И ПРИКРЕПЛЕННЫЕ К ЧАСТИЦАМ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА ОЗЕРА БАЙКАЛ В РАЙОНАХ С РАЗНЫМ ГИДРОЛОГИЧЕСКИМ РЕЖИМОМ

Башенхаева М. В., Елецкая Е. В., Томберг И. В., Марченков А. М., Галачьянц Ю. П.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, maria.bashenkhaeva@gmail.com

Свободноживущие (FL) и прикрепленные к частицам (РА) бактериальные сообщества участвуют в разных этапах круговорота веществ. Бактерии, прикрепленные к частицам играют важную роль в разрушении сложных соединений, которые распадаются на более простые и потребляются свободноживущими бактериями. Озеро Байкал – олиготрофный водоем с низким содержанием питательных веществ, изменение концентрации которых зависит от развития планктонных организмов. Помимо этого взвешенное вещество поступает в озеро с основным притоком – р. Селенгой. Целью работы – провести сравнительный анализ свободноживущих и прикрепленных бактериальных сообществ в районе стока р. Селенги и в литоральной зоне оз. Байкал в подледный и летний период.

Отбор проб проводили в апреле и июле 2018 вблизи пос. Большие Коты и в марте 2019 в районе впадения р. Селенги. Пробы были отобраны батометром на разном расстоянии от берега и с разной глубины. Для выделения ДНК пробы были разделены на две фракции методом фильтрации. Секвенирование фрагментов гена 16S и 18S рРНК проводили на платформе Illumina MiSeq (ЦКП ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург).

Выявлено, что в подледный период в сообществах в районе Больших Котов в FL доминировали *Flavobacterium*; летом преобладали *Crenothrix*, *Methylobacter* и *SAR11_Clade_III*, и археи – *Nitrosarchaeum* и *Nitrososporumilus*. В составе РА подо льдом доминировали *Paracaedibacteraceae* и *Flavobacterium*; летом – *Luteolibacter* и *Flavobacterium*. Сообщества, отобранные в районе р. Селенги, отличались по составу. В устье реки в FL доминировали *Flavobacterium* и *Polaromonas*, чем дальше от устья, тем увеличивалась доля *Cyanobium*. В РА в сообществах устья преобладали бактерии, участвующие в круговороте серы – *Thiothrix*; в удаленных от устья сообществах значительную долю составляли *Acinetobacter* и *Cyanobium*.

Таким образом, показано различие во фракциях свободноживущих и прикрепленных бактериальных сообществ во всех точках отбора, что может быть связано с разными гидрохимическими показателями воды, а также с различным составом микроводорослей в сообществах.

СТЕПЕННОЙ ЗАКОН РАСПРЕДЕЛЕНИЯ CRISPR-CAS СИСТЕМ

Белалов И.^{4,5,}, Павлова Е.¹, Морозов А.², Дэвид Паэс-Эспино³*

¹Департамент математики Колледжа Паломар, Калифорния, США

²Департамент математики Университета Лестера, Великобритания

³Объединенный геномный институт министерства энергетики США

⁴Институт микробиологии им Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН

⁵Механико-математический факультет МГУ

* ilya.belalov@gmail.com

Введение

Система адаптивного иммунитета прокариот состоит из CRISPR-кассет и белков эффекторного и адапторного комплексов. Распознавание чужеродной ДНК осуществляется посредством комплементарного взаимодействия с РНК (крРНК) в составе эффекторного комплекса. При первой попытке инфекции клетки вирусом фрагмент его генома (протоспейсер) встраивается в CRISPR-кассету (фаза адаптации). После транскрипции CRISPR-кассеты и процессинга РНК образуются крРНК комплементарные соответствующим последовательностям геномов вирусов. При повторной инфекции геном данного вируса распознается крРНК и расщепляет-

ся (фаза интерференции). Наличие большого репертуара спейсеров распознающих, разные участки генома вируса, гарантирует выживание популяции микроорганизмов.

Материалы и методы

Мы провели анализ 3858 метагеномов и 6214 полногеномных последовательностей прокариот. Для детекции CRISPR-кассет использовалась программа CRT. Для обработки данных использовался пакет *powerlaw*.

Результаты и обсуждение

На выборке в 3858 метагеномов (2189103 CRISPR-кассет и 11724296 спейсеров) мы установили, что статистическое распределение количества спейсеров в CRISPR-кассетах подчиняется степенному закону распределения вероятностей с экспоненциальным затуханием. Математическая модель, составленная нами на основе экспериментальных данных воспроизводит наблюдаемые распределения.

Выводы

1. Статистическое распределение спейсеров по CRISPR-кассетам подчиняется степенному закону распределения вероятностей с экспоненциальным затуханием.
2. На основе экспериментальных данных построена математическая модель, объясняющая наблюдаемые распределения.
3. Супер микробов не существует.

ДОМИНИРОВАНИЕ МЕТАНОТРОФОВ ГРУППЫ USC α В МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ СООБЩЕСТВАХ ЛЕСОТУНДРЫ ЯМАЛА

Белова С. Э., Данилова О. В., Дедыш С. Н.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, svet-bel@mail.ru

Автоморфные почвы северных широт играют важную роль в глобальном балансе парниковых газов, т. к. являются постоянным стоком атмосферного метана. Филогенетическая принадлежность бактерий, составляющих метановый фильтр этих почв, остаётся малоизученной. Данное исследование было проведено с целью пополнения имеющейся в настоящее время информации о разнообразии метанотрофов «высокого сродства к метану» (группа USC α), для чего были использованы образцы автоморфной тундровой почвы России.

Молекулярная идентификация метанотрофных бактерий на основе анализа *pmoA* генов выявила в качестве единственной обнаруживаемой группы метанотрофов некультивируемую группу USC α (Upland Soil Cluster alpha). Подсчет фрагментов генов *pmoA* с помощью специфичной количественной ПЦР выявил $\sim 10^7$ копий гена *pmoA* на г сухой почвы. Разнообразие *pmoA* было представлено 7 близкородственными филотипами, наиболее многочисленный из которых проявлял 97,5 % идентичности к *pmoA Candidatus Methyloaffinis lahnbergensis*. Дальнейший анализ состава микробного сообщества на основе разнообразия генов 16S рПНК не выявил присутствия в этой почве хорошо изученных метанотрофов порядка *Methylococcales* и семейства *Methylocystaceae*. Самая большая группа прочтений (~ 4 % от общего количества полученных фрагментов генов 16S рПНК бактерий) принадлежала метанотрофам, образующим обширную некультивируемую группу в пределах семейства *Beijerinckiaceae*. Эти прочтения обнаруживали 96–100 и 95–98 % сходства с последовательностями гена 16S рПНК *Ca. Methyloaffinis lahnbergensis* и «*Methylocapsa gorgona*» MG08, соответственно, и были представлены 8 ОТЕ видового уровня, 2 из которых были наиболее многочисленны.

Полученные результаты характеризуют субарктические автоморфные песчаные почвы как уникальное местообитание, заселённое исключительно метанотрофами группы USC α . Поскольку традиционные способы выделения оказались неэффективны для метанотрофов USC α , в настоящее время нами осуществляется поиск новых подходов к культивированию, в частности, с использованием поликарбонатных фильтров.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-14-00034.

ПСИХРОФИЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ РОДА *CRYOBACTERIUM*

Берестовская Ю. Ю., Васильева Л. В.

ФИЦ Биотехнологии РАН 119071 Российская Федерация, Москва

Новый психрофильный представитель рода *Cryobacterium* – штамм 1639 был выделен из образца воды озера Унтерзее (Антарктида), отобранного с глубины 72 м с температурой 4,9 °С. Клетки штамма – короткие грамположительные плеоморфные палочки размером 0,2–0,4×0,9–1,7 мкм. Спор не образовывали. Штамм 1639 – аэробный, гетеротрофный, психрофильный организм, который рос в интервале температур 1–20 °С с оптимумом температурного роста при 10 °С. Пределы pH роста для штамма 1639 были в интервале 4,5–8,7 с оптимумом в щелочной области значений при pH 7,8–8,7. В качестве субстратов психрофильная бактерия использовала преимущественно углеводы: глюкозу, сахарозу, маннозу, мальтозу, фруктозу, лактозу, арабинозу, ксилозу, а также несколько органических кислот: пироват, ацетат и лактат. Основными жирными кислотами были i-C16:0 (49,69 %); ai-C15:0 (17,59 %); C16:1 branched (12,03 %). Основными мембранными липидами клеток были фосфатидилглицерины и гликолипиды. Аминокислотный анализ пептидогликана клеточной стенки показал наличие орнитина, глицина, аланина и глутаминовой кислоты в соотношении 1.0:0.9:0.6:1.0.

Филогенетический анализ показал, что штамм 1639 относится к роду *Cryobacterium* и имеет 98,4 % сходства с типовым штаммом рода *C. arcticum* SK1^T (VKM B- 13262^T). Содержание ГЦ в ДНК составило 65,5 моль%. ДНК – ДНК гибридизация штамма 1639 с типовым штаммом рода составила всего 46 %. Существенные фенотипические отличия нового организма от близкородственных видов и низкий уровень его гибридизации с типовым представителем позволили выделить штамм 1639 в новый вид с присвоением ему названия *Cryobacterium untermeeze* sp. nov.

МЕТАСТАБИЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ И БАКТЕРИИ *ERWINIA AMYLOVORA*

Бесараб Н. В.¹, Летарова М. А.², Голомидова А. К.², Куликов Е. Е.², Лагоненко А. Л.¹,
Евтушенков А. Н.¹, Летаров А. В.²

¹Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского Федерального исследовательского центра биотехнологии РАН, Москва

Фитопатогенная бактерия *Erwinia amylovora* является возбудителем тяжелого заболевания представителей семейства *Rosaceae* - бактериального ожога. В настоящее время бактериофаги *E. amylovora* рассматриваются в качестве природных экологически безопасных антимикробных агентов контроля бактериального ожога. Первым критерием для отбора бактериофага в качестве биоагента является литический жизненный цикл. Однако, несмотря на неспособность к лизогенизации, взаимодействие фага и бактериальной культуры может привести к формированию так называемых «псевдолизогенных ассоциаций» (ПА), состоящих как из бактериофагов, так и жизнеспособных клеток бактерий. В работе исследован феномен формирования ПА фагами *E. amylovora* VyarbaL и Hena2 – представителями семейств *Podoviridae* и *Myoviridae*, и культуры бактерий *E. amylovora* 1/79Sm. Изучение формирования ПА проводили с использованием метода субкультивирования. Материал ПА перекалывали из центра негативной колонии непосредственно на агаризованную питательную среду и проводили 14 пассажей пересева ПА с одновременным контролем выделения ПА фага на газоне индикаторной бактерии *E. amylovora* 1/79Sm. Исследование ПА проводили в 20 повторях.

Было показано, ПА бактериофага VyarbaL и культуры бактерий *E. amylovora* стабильна на протяжении 14 пассажей пересевов. Кроме того, методом ПЦР-анализа ДНК бактериофага детектировалось в 95 % субклонов. ПА бактериофага Hena2 и *E. amylovora* практически по-

теряла бактериофаг к восьмому пересеву. Соотношение общего количества БОЕ к КОЕ в трех случайно выбранных ассоциациях фага *Vyarb1* и бактерии *E. amylovora* для серии пассажей варьировало от одной сотой до 6 десятитысячных. Соотношение БОЕ свободного бактериофага к КОЕ для ПА фага *Vyarb1* и бактерии *E. amylovora* в ряде пассажей составляло от одной сотой до одной десятитысячной. Для ПА фага *Hena2* и бактерии *E. amylovora* соотношение БОЕ к КОЕ было выше – от одной десятой до единицы. Необходимо отметить, что все исследованные клоны бактерий, выделенные из ПА, были устойчивы к стоковому фагу и фагу, выделенному из ПА, однако перекрестно чувствительны к бактериофагам, использованным в данном исследовании.

Исследование показало, что бактериофаги семейств *Podoviridae* и *Myoviridae* и культура бактерий *E. amylovora* формируют метастабильные ассоциации. Можно предположить о малой доле чувствительных к фагу клеток в составе ПА *Hena2* и *E. amylovora*, способных к его поддержанию в ПА. Также можно предположить быструю элиминацию чувствительных клеток в ПА преимущественное размножение фагорезистентных клеток. Полученные результаты полезны при создании коктейлей фагов, а также для понимания событий, сопровождающих встречу фагов и клеток бактерий на поверхности растений.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФОРМЫ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ У *ESCHERICHIA COLI*

Бессонова Т. А.¹, Рыбина А. А.², Дахновец А. И.³, Гарущанц С. К.⁴, Озолин О. Н.¹,
Тутукина М. Н.^{2,1,4}, Гельфанд М. С.^{2,4}

¹Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «ПНЦБИ РАН», Пущино

²Сколковский институт науки и технологий, Москва

³МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

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

Введение

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции является важной частью быстрой адаптации бактерий. Сеть транскрипционной регуляции, обеспечивающая переход свободно живущих патогенов к жизни внутри организма хозяина, требует особенно тонкой настройки. Не так давно было обнаружено, что ключевой регулятор генов вирулентности шигеллы *VirF* имеет несколько белковых форм, которые транслируются с одного гена. До недавнего времени единственным примером альтернативного кодирования у *E. coli* был сиртуин *SobB*. Мы впервые зарегистрировали синтез нескольких белковых форм для трёх регуляторов транскрипции *E. coli* – *YjjM* (*LgoR*), *LeuO* и *YihW* (*CsqR*).

Материалы и методы

Выравнивание проводили MEGA или T-coffee. Пространственную структуру предсказывали SwissModel и Phyre 2. Изоформы белков детектировали вестерн-блоттингом. Делеционные и мутантные штаммы были получены с помощью Gene doctoring.

Результаты и обсуждение

Как и в случае *VirF*, синтез трех форм *YjjM* (35 кДа, 30кДа и 25 кДа) зависел от температурных условий и аэрации, а также от присутствия в клетке белка нуклеоида и сайленсера *H-NS*. Такое сходство логично, поскольку в соответствии с нашими данными, в регулоне *YjjM* находятся все детерминанты вирулентности *E. coli*. Для *LeuO*, который также может принимать участие в регуляции вирулентности кишечной палочки, было обнаружено две четко различимые формы белка (35,6 кДа и 30кДа), синтез которых также зависел от присутствия кислорода, *H-NS* и *YjjM*. Неожиданно мы обнаружили, что *YihW*, локальный регулятор кассеты генов, принимающей участие в метаболизме сульфоглюкозы и лактозы, также может синтезироваться в двух формах, одна из которых существенно активируется при росте на сульфоглюкозе. Во всех случаях непосредственно перед геном или внутри него есть дополнительный промотор, с которого, по-видимому, и начинается синтез укороченной мРНК. Все три фактора имеют НТН-ДНК-связывающий домен, структура которого при синтезе укороченных форм меняется, что может приводить к изменению мотива и, следовательно, набора мишеней.

Закключение

Синтез укороченных форм транскрипционных регуляторов может быть одним из механизмов для дополнительной настройки и расширения пула их мишеней при смене условий, в особенности при заражении организма хозяина и переходе к кислородному голоданию.

Работа поддержана РФФ №_18-14-00348-П.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В ОТВЕТ НА ИНАКТИВАЦИЮ ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ ГЕНОВ В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ

Бидюк В. А., Александров А. И.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Целый ряд грибковых патогенов вызывают смертельно опасные заболевания человека. При этом существует серьезная проблема недостатка эффективных средств для борьбы с этими патогенами. Кроме того, для грибов крайне мало известно о том, нарушения каких именно генов могут вызывать гибель. При этом сведения об этих генах могут быть использованы для разработки новых типов противогрибковых препаратов.

Для того, чтобы обнаружить белки, инактивация которых может эффективно приводить к клеточной гибели, в данном исследовании использовалась коллекция температурочувствительных мутантов на основе штамма *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. Белок, имеющий температурочувствительное нарушение, нормально функционирует при температурах 24–30 °С, однако инактивируется при помещении клеток в непермиссивную температуру 37 °С. Для того чтобы понять, инактивация каких белков может эффективно убивать клетки дрожжей, логарифмические культуры изучаемых штаммов помещали в YPD или дистиллированную воду в термостат с температурой 24 °С и 37 °С. Для исследования жизнеспособности клетки высевали для подсчета колониеобразующих единиц. Для детекции активных форм кислорода (АФК) в клетках использовались флуоресцентные красители DHE и DCFH-DA. Для измерения степени поляризации клеточной мембраны использовали флуоресцентный краситель DiBAC4(3). Пермеабиллизация 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 было выделено 10 мутантов, жизнеспособность которых заметно снижалась после инкубации в воде на 37 °С на протяжении 24 часов. Эти штаммы были проверены на уровень АФК; оказалось, что для почти всех штаммов количество АФК превышает контрольные значения больше чем в два раза. 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.

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 повышением уровня АФК и нарушением потенциала клеточной мембраны. Кроме того, было показано, что гибель во многих случаях не является следствием пермеабиллизации мембраны, что указывает на то, что клетки гибнут по апоптозо-подобному пути.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-10115.

МИКОБИОТА ФИЛЛОПЛАНЫ РАСТЕНИЙ В СРАВНЕНИИ С ГРИБАМИ, ПРИСУТСТВУЮЩИМИ В ПОЧВЕ И В ВОЗДУХЕ

Благовещенская Е. Ю., Царелунга А. А.

МГУ им. М. В. Ломоносова», биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru

Введение. В филлоплане растений часто могут присутствовать различные сапротрофные грибы. Состав и функции подобных сообществ изучены крайне слабо, но предполагается, что они могут оказывать влияние как на вегетирующие листья, особенно при взаимодействии с патогенными грибами, так и выступать в качестве первичных членов сукцессии грибов, вызывающих разложение листового опада. Целью данной работы является выявление видового состава сапротрофных микромицетов, населяющих филлоплану различных растений, и сравнение с видовыми составами грибов, выделяемых из почвы и воздуха.

Материалы и методы. Отбор образцов проводили в 2020 г. на участке около биологического факультета МГУ. Случайным образом было отобрано по 20 экземпляров двух видов растений (*Acer platanoides* и *Trifolium pratense*). Выделение эпифитных грибов проводили на картофельно-глюкозный агар (КГА) методом отпечатков. На том же участке были отобраны 5 почвенных образцов; выделение проводили методом серийных разведений на КГА, на среду Чапека и сусло-агар. Выделение грибов из воздуха проводили методом седиментации (30 чашек с КГА, время экспозиции – 10 мин).

Результаты и обсуждение. Всего на клевере выявлено 16 видов грибов, на клене – 14, из воздуха – 13. Из почвенных образцов на КГА было выявлено 14 видов, суммарно, с учетом других сред, – 20 видов. Подавляющее большинство видов относятся к анаморфным аскомицетам. Микобиота клена и клевера значительно отличалась. Так, хотя на обоих видах растений присутствуют многие обычные эпифитные виды грибов, эти виды имеют разные показатели относительного обилия и встречаемости. Например, такой стандартный эпифит как *Cladosporium herbarum* выделяется и там, и там, но для клена он входит в число доминантов (встречаемость 75 %), а на клевере выделяется только в 6 % случаев.

Список видов микромицетов, выделяемых из почвенных образцов, типичен для почв Московской области и наибольшую встречаемость там имеют эвтропические грибы (преимущественно *Penicillium* spp.). При анализе грибов, выделенных из воздуха, обнаружены как типичные виды филлопланы, так и достаточно высокая представленность эвтропических и муко-розовых. Тем не менее, исходя из значений коэффициентов сходства Сьеренсена-Чекановского, можно видеть, что аэромикота кластеризуется вместе с микобиотой филлопланы растений, в то время как почвенные образцы формируют независимую кладу.

Заключение. Хотя видовое разнообразие грибов-эпифитов на разных видах растений и отличается, можно выделить основной комплекс видов, составляющих основу сообщества грибов филлопланы. Все эти виды характеризуются наличием пигментации, что, вероятно, связано с повышенной инсоляцией листьев как среды обитания. Видовое сообщество микромицетов почв существенно отличается от грибов филлопланы. Напротив, комплекс видов, выделяемых из воздуха в целом схож с комплексом эпифитных видов, что может быть связано с тем, что в осенний период грибы филлопланы активно спорулируют и их споры попадают в воздух.

АНАЛИЗ И РЕКОНСТРУКЦИЯ МУЛЬТИВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК, ФОРМИРУЕМЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНА

Богданов К. И., Плакунов В. К., Ганнесен А. В., Мартьянов С. В., Журина М. В.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва,

Введение (актуальность) и цель работы. Образование биопленок на пластиках – важная проблема как для фундаментальной науки, так и для практической биотехнологии и медицины (образование биопленок ускоряет коррозию многих материалов, а нередко они являются резервуаром патогенов). Целью этой работы является анализ и реконструкция мульт-

тивидовых биопленок из биоценозов, подвергнутых антропогенному воздействию, растущих на поверхности полиэтилена низкой плотности.

Материалы и методы. В качестве тестируемых образцов в работе использовали пластины полиэтилена высокого давления (ПВД) размером 1×2 см и толщиной 150 мкм (ГОСТ 10354-82), стерилизованные ультрафиолетовым излучением (УФ) в течение 60 мин, по 30 мин с каждой стороны. Сообщества микроорганизмов для работы предварительно выделяли из ряда источников: с поверхности образцов полиэтиленов, отобранных в компостном комплексе компании ООО «Грунт Эко», из прибрежной зоны Можайского водохранилища, со свалки в г. Новомосковск и с образцов полиэтилена, инкубируемых в почве (г. Мемьо, Мьянма) в течение 180 суток. Также сообщества выделяли с поверхности пресса для формования полиэтилена из ИНХС РАН и с поверхности пластикового сосуда. Для количественной оценки биомассы биопленок, сформированных на поверхности тестируемых пластин ПВД, применяли метод окрашивания кристаллическим фиолетовым (КФ). Количество жизнеспособных клеток в биопленках оценивали окрашиванием метаболизируемым красителем МТТ. Далее биопленки удаляли и исследовали поверхность полиэтилена денситометрическим методом (Журина, 2020).

Результаты и обсуждение. Проведённые исследования показали, что наиболее интенсивно полиэтилен разрушают сообщества, выделенные с поверхности полиэтилена из Можайского водохранилища и с образцов, инкубируемых в почве Мьянмы. Также высокую интенсивность деструкции полиэтилена продемонстрировали сообщества, выделенные из компоста. Состав сообществ изучен методом NGS; из самых перспективных сообществ выделены и идентифицированы чистые культуры (pp. *Rhodococcus*, *Parapedobacter*, *Paenibacillus*, *Brevundimonas*, *Rhizobium*, *Gordonia* и др.).

Выводы (Заключение) Получены биопленки с поверхности полиэтилена из ряда мест, подвергнутых антропогенному воздействию. Было определено суммарное количество биопленок и количество в них метаболически активных клеток, а также степень повреждения поверхности полиэтилена вызванная мультивидовыми биопленками. Из наиболее перспективных сообществ изолированы чистые культуры, из которых в дальнейшем реконструированы биопленки, способные расти на поверхности полиэтилена.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № мк-18-29-05048.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНТЕРАКТИВНЫЙ КАТАЛОГ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И БИТОКСИНОВ — СОВРЕМЕННАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ УЧЁТА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ И АНАЛИЗА ИХ ГЕНОМОВ

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

¹ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск

²ФГАНУ ЦИТИС, Москва

Национальный интерактивный каталог патогенных микроорганизмов и биотоксинов (НИК ПМБ) разрабатывается ФБУН ГНЦ ПМБ и ФГАНУ ЦИТИС в рамках деятельности центра геномных исследований мирового уровня. В 2020 году сотрудниками ФГАНУ ЦИТИС разработано специализированное программное обеспечение для работы с каталогом, а в 2021 году на базе ФБУН ГНЦ ПМБ создан центр обработки данных, необходимых для работы программы.

В национальном интерактивном каталоге реализованы функции учёта паспортных характеристик депонированных культур микроорганизмов, способов и мест хранения штаммов, а также имеются сервисы анализа геномной информации. Информационная система НИК ПМБ разрабатывается с целью обобщения информации о штаммах патогенных микроорганизмов, депонированных в разных коллекциях, функционирующих в Российской Федерации. В системе национального интерактивного каталога реализованы функции обработки данных

массированного параллельного секвенирования – метагеномный анализ, реконструкция геномных последовательностей на основании данных массированного параллельного секвенирования, анализ нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма Blast.

Пользователи каталога имеют различные уровни доступа к содержимому. Существует несколько категорий пользователей – клиент коллекции, непосредственный исполнитель работ, ответственный исполнитель, а также руководитель коллекции. Клиентам коллекции предоставляется доступ к сервисам обработки данных массированного параллельного секвенирования – метагеномному анализу, сборке полногеномных последовательностей из архивов ридов, а также анализу нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма Blast. Помимо этого, клиент коллекции может осуществлять выбор штамма, имеющегося в коллекции, на основании его генетических характеристик и информации, заложенной в паспорте.

Непосредственный исполнитель дополнительно имеет возможность вносить информацию об экспериментах, проведенных со штаммами, депонированными в фондах коллекции. Для исключения ошибок на этапе заполнения все изменения, вносимые непосредственным исполнителем, подтверждаются ответственным исполнителем. Руководитель коллекции определяет порядок работ с клиентами коллекции и контролирует деятельность сотрудников.

Организация централизованного контроля за деятельностью коллекций патогенных микроорганизмов осуществляется через личный кабинет центра мониторинга. Пользователи центра мониторинга имеют права для получения отчетов о состоянии коллекционных фондов, но не способны вносить и изменять информацию о депонированных микроорганизмах и проводимых исследованиях.

Национальный интерактивный каталог создается в рамках соглашения 075-15-2019-1671 от 31.10.2019 с Министерством образования РФ с целью обобщения информации о штаммах, депонированных в разных коллекциях и доступных для проведения фундаментальных и практических исследований.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ПУТЬ В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ СОДОВЫХ ОЗЕР

Болтянская Ю. В., Кевбрин В. В., Пименов Н. В.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, juvb@yandex.ru

Работа обобщает серию многолетних исследований микробного разнообразия эпиконтинентальных содовых озер и касается проблемы деградации биополимеров, важнейшими из которых являются белки. Целью исследований являлось выделение и описание алкалофильных микроорганизмов, ответственных за разложение белковой компоненты биомассы первичных продуцентов (в первую очередь – цианобактерий), выявление их функциональной роли, моделирование взаимоотношений «продуцент – деструктор» и реконструкцию соответствующего звена трофической системы алкалофильного микробного сообщества. К началу работы гидролитическое звено являлось его наименее изученной частью.

Объектами исследования являлись образцы илов содовых озер Танатар (Россия), а также альгологически чистые лабораторные культуры цианобактерий, типичных для данных содовых озер и/или являющиеся эдификаторами циано-бактериального сообщества в них. Работа проводилась с использованием классических методов (микробиологических, аналитических, биохимических, филогенетических).

Выделены и охарактеризованы два истинных протеолитика-деструктора – анаэробный *Proteinivorax tanatarense* gen. nov., sp. nov. и аэробный *Alcalicaulis satelles* gen. nov., sp. nov. Группу диссипотрофов, т. е. организмов, использующих низкомолекулярные вещества, рассеиваемые из мест их разложения гидролитиками, дополнили еще один вид *Proteinivorax* (*P. hydrogeniformans*) и аэробный спутник цианобактерии *Geitlerinema* sp. *Natronospirillum operosum* gen. nov., sp. nov. В опытах по моделированию темнового разложения интактной биомассы цианобактерии на примере *P. tanatarense* продемонстрировано литическое дей-

ствии организма-деструктора, позволяющее регулировать численность первичных продуцентов в ночных условиях, когда процесс фотосинтеза подавлен, и выделения кислорода не происходит. Внеклеточные пептидазы новых организмов проявили устойчивость к ПАВ, а также к высоким значениям pH и солености, что указывает на возможность практического применения этих ферментов.

Таким образом, реконструирована схема разложения белков в аэробных и анаэробных условиях. Выявление «недостающего» звена в трофической системе алкалофильного микробного сообщества является очередным свидетельством его автономности, что, в свою очередь, представляется одним из ключевых подтверждений того, что современные содовые озера можно считать аналогами существовавших на ранних этапах формирования биосферы на Земле.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО ВАЖНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES EUBAYANUS*, *S. BAYANUS* VAR. *BAYANUS* И *S. BAYANUS* VAR. *UVARUM*

Боровкова А. Н.^{1,2*}, Наумов Г. И.¹, Наумова Е. С.¹

¹«Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва

²МГУ им. М. В. Ломоносова, кафедра микологии и альгологии, Москва,
*al.borovkova_93@mail.ru,

В настоящее время род *Saccharomyces* включает восемь биологических видов: *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. jurei*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* (Naumov et al., 2000; Kurtzman, 2003; Vaughan-Martini, Martini, 2011; Naseeb et al., 2017). Вид *S. bayanus* гетерогенен и включает две частично-генетически изолированные разновидности: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum* (Naumova et al., 2005). Специфической экологической нишей *S. bayanus* var. *uvarum* является виноделие и виноградарство при пониженных температурах, тогда как дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus* представлены штаммами, загрязняющими пивоварение. Родственные им дрожжи *S. eubayanus* были первоначально описаны на изолятах из Аргентины, а позже обнаружены в Китае, США и Канаде (Libkind et al., 2011; Bing et al., 2014; Peris et al., 2016). В Европе геном *S. eubayanus* обнаружен только у гибридных пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus* (Baker et al., 2015; Hebly et al., 2015).

С помощью методов молекулярной и классической генетики нами изучено генетическое родство дрожжей *S. eubayanus*, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum*. Результаты генетического анализа гибридов *S. eubayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum* и *S. bayanus* var. *bayanus* убедительно доказывают, что у этих дрожжей нет полной генетической изоляции. Выживаемость аскоспор существенно зависела от родительских комбинаций и составила 55–62 % у гибридов *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. eubayanus*, 14–39 % у *S. bayanus* var. *bayanus* × *S. bayanus* var. *uvarum* и 11–14 % у *S. bayanus* var. *uvarum* × *S. eubayanus*. Независимо от выживаемости аскоспор у всех изученных гибридов наблюдалось регулярное мейотическое расщепление контрольных маркеров. Следует отметить, что контрольные скрещивания с дрожжами *S. cerevisiae* были полностью стерильны.

Установлено, что три указанные популяции дрожжей *S. bayanus* можно дифференцировать молекулярным каритипированием. Характерная для *S. bayanus* var. *uvarum* реципрокная транслокация, затрагивающая хромосомы VI и X, отсутствует у *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*. Сравнительный анализ ряда ядерных и митохондриальных генов также выявил более близкое генетическое родство последних двух популяций.

Таким образом, между дрожжами *S. eubayanus*, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum* нет полной межвидовой постзиготической изоляции. Согласно полученным генетическим и молекулярным данным указанные таксоны относятся к одному и тому же виду, обладая дивергенцией геномов на уровне таксономических разновидностей.

НОВАЯ МЕЗОФИЛЬНАЯ НИТЧАТАЯ АНОКСИГЕННАЯ ФОТОТРОФНАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ МОНГОЛИИ

Брянцева И. А.¹, Груздев Д. С.², Горленко В. М.¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, bryantseva@mail.ru

² SciBear LLC, Таллин, Эстония

Работа посвящена изучению накопительной культуры нитчатой аноксигенной фототрофной бактерии (НАФБ), ранее по 16S rRNA отнесенной к '*Ca. Chloroploca asiatica*'.

НАФБ М50-1, выделенная из микробного мата содового оз. Чухын Нур (Монголия; pH 8,0–9,3, соленость 5–14 г/л) исследована методами микроскопии, ультратонких срезов, спектрофотометрии, ВЭЖХ и молекулярно-генетическими.

Клетки 0,5–0,7 × 1,0–3,0 мкм с газовыми везикулами и хлоросомами были объединены в волнистые или спирально извитые короткие нити, покрытые тонким чехлом, тогда как для '*Ca. Chloroploca asiatica*' характерны слегка изогнутые.

Максимумы поглощения пигментов *in vivo* 455 и 727 нм, ацетон-метанолового экстракта 432, (450–460), (470–480), (610–620), 661 и (770) нм. Основной пигмент бактериохлорофилл (Бхл) *d*, а не Бхл *c* как у '*Ca. Chloroploca asiatica*'. Содержание Бхл *a* = 12,6 mol% (Бхл *a* : Бхл *d* = 12,6 : 87,4 mol%). У '*Ca. Chloroploca asiatica*' В7-9 Бхл *a* 1,6 mol%. Количество каротиноидов 65,7 mol% от суммы всех пигментов (Бхл *a* + *d* : Кар = 34,3 : 65,7 mol%). β-каротин и γ-каротин преобладали, у '*Ca. Chloroploca asiatica*' В7-9 доминировал лишь β-каротин.

Анаэробная, облигатно фототрофная бактерия росла в присутствии сульфида 0,3–0,7 г/л и бикарбоната 3–5 г/л. Геном имел все необходимые гены для фиксации CO₂ посредством 3-гидроксипропионатного пути и хинон оксидоредуктазы IV типа, а не II как у *Chloroflexus*. Генов *nifHDBK* ответственных за фиксацию N₂ нет. Сравнение генома М50-1 с близкородственной '*Ca. Chloroploca asiatica*' В7-9 по результатам *in silico* dDDH и ANI было 53,4 % и 94,0 % соответственно (=межвидовые различия). Г+Ц в ДНК 58,6 %. Последовательности генома и 16S рРНК доступны в GenBank (SIJK000000000 и SIJK02000154 соответственно).

Основываясь на сравнении фенотипических и филогенетических признаков исследованной бактерии с известными представителями филума *Chloroflexota*, НАФБ М50-1 предложено классифицировать как новый вид рода *Chloroploca* '*Candidatus Chloroploca mongolica*' sp. nov. (Bryantseva et al., 2021).

Финансовая поддержка: гранты РФФИ № 19-04-00423, 19-04-00377, № 18-04-00684а и Министерства науки и высшего образования РФ.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРСИСТЕНЦИИ ПРОСТЕЙШИХ BLASTOCYSTIS SPP.

Бугеро Н. В., Ильина Н. А.

Псковский государственный университет, Псков, bugero@mail.ru; n-ilina@mail.ru

В последнее десятилетие в работах многих авторов показана роль условно-патогенных микроорганизмов в возникновении кишечных инфекций. Уровень заболеваемости паразитарными инвазиями и их значение для здравоохранения и страны в целом остаются по ряду причин недооцененными.

Среди паразитарных микроорганизмов широкое распространение имеет *Blastocystis* spp. Рост интереса ученых и практических паразитологов к этому простейшему объясняется его распространением в мире. Он обнаруживается у 30–50 % жителей развивающихся стран и у 1,5–10 % развитых. Кроме того, бластоцисты часто присутствуют у больных гастроэнтерологическими заболеваниями, аллергозами, дерматозами. Однако в клинической практике лаборанты часто не регистрируют наличие бластоцист в исследуемом материале. Это объясняется тем, что патогенная природа простейшего остается спорной, а, следовательно, регистрация результатов не является строго обязательной, а также – слабым знанием лаборантами этого объекта.

Установлено, что бластоцисты оказывают существенное влияние на формирование микробиоценоза кишечника человека, сопровождающееся снижением высеваемости индигенной флоры, а также увеличением количества условно-патогенной. Показано, что нарушение биоценологических взаимоотношений между патогенными бактериями и нормальной кишечной микрофлорой является одним из факторов, влияющих на развитие многих заболеваний, особенно, имеющих хроническое течение.

В связи с этим при определении этиологической значимости условно-патогенной флоры, к которой в полной мере можно отнести и группу паразитических простейших *Blastocystis* spp. наряду с их количеством необходимо учитывать и факторы, способствующие персистенции, которые рассматриваются в качестве маркера, обуславливающего длительное переживание патогена в организме хозяина.

Цель исследования – сравнительная характеристика персистентного потенциала паразитоценоза кишечника человека, в условиях воздействия комплекса неблагоприятных факторов производственной среды.

Для реализации цели работы были поставлены **задачи**:

1. Изучить особенности микробиоценоза толстого отдела кишечника человека в условиях воздействия комплекса дестабилизирующих факторов производственной среды.

2. Определить частоту встречаемости в кишечнике рабочих простейших *Blastocystis* spp. в норме и при дисбиозе.

3. Изучить биологические свойства бластоцист на примере антилизоцимной, антилактоферриновой и антигистоновой активностей.

Результаты исследования и их обсуждение.

Обследовано 129 рабочих предприятия в возрасте от 25 до 55 лет. Контрольную группу составили 50 практически здоровых лиц.

Изучение микробиома кишечника лиц, работающих в условиях литейного производства, характеризующееся комплексным воздействием на организм обследуемых факторов физической и химической природы позволили обнаружить качественные и количественные изменения в составе нормофлоры толстого отдела кишечника. Показано снижение частоты встречаемости представителей облигатной микрофлоры и увеличение условно-патогенной группы. Экспериментальные данные показали у лиц обследуемой группы наличие четырех степеней тяжести дисбиотических нарушений, которые находились в прямой зависимости от стажа работы на предприятии. У лиц со стажем работы на предприятии 10–15 лет и более в $73,56 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$) случаев проявлялись изменения дисбиоза кишечника IV степени тяжести. У лиц контрольной группы видимых изменений в составе облигатных представителей отмечено не было ($p < 0,05$).

Изучение паразитоценоза кишечника обследуемого биотопа показало доминирование группы простейших *Blastocystis* spp. ($62,00 \pm 5,4\%$). Проведенные исследования показали, что в зависимости от продолжительности работы в литейном цехе обнаружение бластоцист в фекалиях рабочих возрастает с $56,30 \pm 4,6\%$ в первой группе, где продолжительность работы составила от 1 года до 5 лет, до $85,63 \pm 7,8\%$ у обследованных, со стажем работы 10–15 лет и более.

Проведенные исследования позволили определить количественный состав штаммов бластоцист, выделенных у обследуемых лиц, в зависимости от степени дисбиоза кишечника. Наибольшее число простейших *Blastocystis* spp. обнаруживали в фекалиях лиц с дисбиотическими изменениями II степени тяжести – 28 штаммов ($47,50 \pm 1,7\%$, $p < 0,03$). Полученные данные могут быть интерпретированы в контексте того, что простейшие бластоцисты совместно с сообществом других микроорганизмов являются участниками формирования особого микробиоценоза изучаемого биотопа, характеризующегося уменьшением представителей облигатной флоры и значительным увеличением факультативной.

В работе получены данные о высоком уровне выраженности персистентных свойств штаммов *Blastocystis* spp. на примере АЛА, АЛФА и АГА. Результаты исследования позволили их не только обнаружить, но и ранжировать по степени их информативности. Ведущим персистентным признаком, определяющим формирование микробиоценоза кишечника данного биотопа, является их антилизоцимный признак.

Установлено увеличение персистентных характеристик бластоцист с нарастанием глубины микрoэкологических нарушений в кишечнике. Обнаруженная связь между персистентными признаками простейших и глубиной нарушений в микробиоценозе кишечника позволила рассматривать факторы персистенции в качестве маркеров дисбиотического процесса.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ШТАММА *PSEUDOMONAS SYRINGAE* БИМ В-268, ПАТОГЕНА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Бузиков Р. М.¹, Пилипчук Т. А.², Валентович Л. Н.², Коломиец Э. И.², Шадрин А. М.¹

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино,
a87h5n1@gmail.com

²Институт Микробиологии НАН, Минск, tanya.pilipchuk@tut.by

Введение и цель работы. *Pseudomonas syringae* это распространённые фитопатогенные бактерии, вызывающий разнообразные бактериозы у широкого круга растений. Известны способности представителей этого вида псевдомонад к образованию биоплёнок и кворум-эффекту. Известно порядка 60 патоваров *P. syringae*, которые ежегодно приносят убытки сельскому хозяйству, особенно при заражениях плодовых деревьев.

Наше исследование посвящено штамму БИМ В-268, который был изолирован на территории Беларуси из листьев черной смородины, и используется для тестирования эффективности действия биопестицидов на основе бактериофагов.

Материалы и методы. ДНК штамма БИМ В-268 выделена фенольным способом, подготовлена и секвенирована: методом Oxford Nanopore получено 46590 длинных (до 85162 нк) ридов и с помощью Illumina – 2054402 коротких прочтений, длиной 251 нк).

Риды доступны на NCBI: SRR13414004 и SRR13414003, подвергнуты триммингу с помощью Trimmomatic и отфильтрованы по качеству не ниже 99 %. Для сборки генома использован Flye assembler v.2.8.3 с последующей корректировкой результата при помощи Bowtie2 и Pilon путем наложения на сборку ридов и коррекции.

Геном аннотирован с помощью NCBI PGAP и депонирован в GenBank: CP068034.2.

Результаты и обсуждение. На основе полученных данных осуществлена сборка кольцевой хромосомы длиной 6018586 п.н., покрытие сборки ридами составило 120 для Illumina и 14 для Oxford Nanopore. Выявлено 5004 CDS, кодирующих белки; 64 гена тРНК; 16 генов рРНК, объединенных в 5 кластеров; 4 гена нкРНК; и 77 псевдогенов. Плазмид не обнаружено.

Геном БИМ В-268 содержал набор генов факторов фитопатогенности: ген белка INA, облегчающего кристаллизацию воды при относительно высоких температурах, которая приводит к обморожению растений; гены *surA* и *surC*, отвечающие за нерибосомальный синтез сиренгопептина.

Сравнение генома БИМ В-268 с помощью ANIb tool выявило максимальное сходство с патоваром *P. syringae* pv. *syringae*. Мультилокусное типирование по генам *gap*, *gyrB*, *rpoD*, *pfkB*, *pgi*, *gltB* и *asnV* показало, что БИМ В-268 наиболее близок к патоварам, поражающим лещину.

Выводы. Таким образом, нами собран и проанализирован геном *Pseudomonas syringae* БИМ В-268, что является необходимым условием для его дальнейшего изучения и позволит использовать этот штамм при исследованиях бактериофагов псевдомонад в качестве модельной системы бактерии-хозяина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-516-00015 и №Б20Р-078.

НОВАЯ ПРОСТЕКОБАКТЕРИЯ *PROSTHECODIMORPHA STALEYI*

Васильева Л. В., Пименов Н. В.

ФИЦ биотехнологии РАН, Москва, inmi@inmi.ru

Впервые простекобактерии, имеющие бинарный цикл развития, были выделены из водных местообитаний и описаны как *Prosthecomicrobium hirshii*, с типовым штаммом 16^T (ATCC 27832). Характерной особенностью *Prosthecomicrobium hirschi* является диморфный цикл развития, состоящий из двух морфологических типов. Один тип клеток состоит из подвижных клеток, которые имеют короткие простеки. Другой тип клеток имеет длинные простеки и является неподвижным (Staley, 1984).

Штамм 22^T, был выделен из такировидной почвы рисового поля на массиве Акдала, в нижнем течении реки Или в Казахстане. Солому вносили в почву в качестве удобрения для роста риса. Клетки штамма 22^T были обнаружены в почве на завершающей стадии разложения соломы. Штамм 22^T имел характерную для *Prosthecomicrobium hirshii* морфологию клеток и диморфный цикл развития. Неподвижные клетки обладали длинными простеками размером более 2.0 мкм. Подвижные клетки с многочисленными короткими простеками с одним полярным или субполярно расположенным жгутиком имели размер менее 0,35 мкм. Отдельные клетки с короткими, так и длинными простеками одновременно, могли быть подвижными. Штамм 22^T был морфологически идентичен типовому штамму вида *Prosthecomicrobium hirshii*. Типичная морфология клеток на лабораторных средах сохранялась только при низких концентрациях субстрата 0,01–0,03 %. Повышение концентрации приводило к укорочению простек, заполнению клеток поли-бетагидроксибутиратом и утрате подвижности у клеток. Штамм 22^T как и *Prosthecomicrobium hirschii* является типичным представителем аэробных олиготрофных бактерий.

Филогенетический анализ показал, что штамм 22^T принадлежал к роду *Prosthecomicrobium*. Несмотря на 100 % уровень сходства с *Prosthecomicrobium hirschii* 16^T по гену 16S рПНК, штамм 22^T относится к новому виду. На филогеномном дереве штамм 22^T образует ветвь с *Prosthecomicrobium hirschii* 16^T и *Siculibacillus lacustris* SA-279^T. Значения ANI (93,6 %) и dDDH (47,6 %), для генома наиболее близкого вида *Prosthecomicrobium hirschii* 16^T, были ниже предельных значений. Значения AAI между штаммом 22^T и близкородственными *Prosthecomicrobium hirschii* 16^T и *Siculibacillus lacustris* SA-279^T составили 94,5 и 64,5 соответственно. Данные AAI также показали, что штаммы 22^T и 16^T удалены от членов семейства *Hyphomicrobiaceae* (56,0–57,0 %) и *Prosthecomicrobium pneumaticum* DSM 16268^T (60,8–60,9 %). Полученное филогеномное дерево показало, что род *Prosthecomicrobium* был полифилетическим. Штаммы 22^T и 16^T образовывали ветвь с родами семейства *Ancalomicrobiaceae*, а штамм *Prosthecomicrobium pneumaticum* DSM 16268^T образовывал ветвь с родами *Bauldia* и *Kaistia* семейства *Kaistiaceae*. Поэтому род *Prosthecomicrobium* следует исключить из семейства *Hyphomicrobiaceae* и переклассифицировать в члены семейства *Kaistiaceae*. Штаммы 22^T и 16^T следует отнести к *Ancalomicrobiaceae* с введением нового рода *Prosthecodimorpha*, который будет содержать *Prosthecodimorpha hirschii* и *Prosthecodimorpha staleyi* (штамм 22^T), которые оставляют в качестве единственного вида в роде *Prosthecomicrobium* типовой вид *Prosthecomicrobium pneumaticum*.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ БИООБРАСТАНИЕ И ВТОРИЧНОЕ БАКТЕРИАЛЬНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ СИСТЕМ ЗАМКНУТОГО ВОДОСНАБЖЕНИЯ ГАЛЬВАНИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Веденеева Н. В.¹, Тихомирова Е. И.¹, Скиданов Е. В.², Матвеев Ю. А.¹

¹Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.

²Научно-производственное предприятие «ЛИССКОН», Саратов

В Российской Федерации в последнее десятилетие активно развивается Концепция экономики замкнутого цикла с бережливым отношением к окружающей среде и природным ресурсам, которая включает в себя использование оборотной системы водоснабжения на промышленных предприятиях. Однако существует проблема вторичного бактериального загрязнения в подобных системах в результате процессов биообрастания на внутренних поверхностях технологического оборудования, приводящих к снижению эффективности. Эта проблема достаточно часто упоминается в специальной научной литературе, однако для гальванических производств является относительно новой. Это связано с тем, что гальванические сточные воды содержат тяжелые металлы, в том числе соединения хрома (VI), в редких случаях кадмий и свинец; концентрированные кислоты и щёлочи, иногда цианистые соединения. Поэтому развитие бактериальной флоры в системах очистки воды, содержащих такие агрессивные вещества, достаточно редкое явление. На сегодняшний день существует несколько способов снижения микробной контаминации в системах технологического водоснабжения:

хлорирование, озонирование, а также обработка неокисляющими дезинфектантами (ПАВы, соли четвертичных аммониевых оснований и т. д.). Однако успешному подбору дезинфектанта предшествует оценка видового состава и степени бактериального загрязнения.

В нашей работе проведена оценка бактериального загрязнения систем водоотведения гальванического производства на предприятии г. Саратова. В процессе исследования из проб воды и промывного осадка, отобранных в системе технического водоснабжения предприятия, были выделены и идентифицированы два штамма микроорганизмов, вызывающих микробное загрязнение. Изучение морфологических и культуральных свойств выделенных штаммов бактерий позволило отнести их к роду *Bacillus*. Видовую принадлежность выявленных штаммов подтверждали путем проведения метагеномного анализа состава микробных сообществ по гену 16S рРНК на платформе MiSeq. Исследования проведены на базе Междисциплинарного центра протеомных исследований Казанского федерального университета. В результате анализа состава микробных сообществ по гену 16S рРНК (вариабельных участков 16S rDNA) по базе данных GenBank на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3730 установлена гомология первого штамма с типовыми штаммами подгруппы *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* в пределах 99,4–99,9 %. При идентификации второго выделенного штамма результаты гомологии с *B. altitudinis* составила 99,7 %. Изучение свойств выделенных штаммов показало, что они не являются патогенными и токсигенными.

Для снижения микробной загрузки в системе технического водоснабжения провели серию экспериментов по подбору биоцида. Исследовали несколько вариантов дезинфектантов разных групп: окисляющие (хлорамин (хлорпроизводное аммиака), перекись водорода) и неокисляющие (полимерные производные полигексаметиленгуа-нидина (ПГМГ) производства АО «НПК Медиана-фильтр» и полиазиолидинаммоний-ионгидрата (ПААГ-М) производства ООО «Константа»). Установлено, что полимерные соединения обладали большей эффективностью по сравнению с дезинфектантами на основе хлора. Водный раствор полигексаметиленгуанидина обладал лучшим бактерицидным действием на микроорганизмы, поэтому был рекомендован для борьбы со сложившимся бактериальным загрязнением систем водоотведения гальванического производства на предприятии г. Саратова.

АНАЛИЗ ГЕНОВ РОДОПСИНОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ В КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММАХ И ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТАХ ВОДОРΟΣЛЕЙ *CHLOROPHYTA* И *CRYPTOPHYTA*

Виноградова Е. Н.^{1,2}, Карпова О. В.¹, Лобакова Е. С.¹

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru

²НИЦ «Курчатовский Институт», НБИКС Геномный Центр,
Москва, nrckigc@nrckigc.ru

Цель проекта заключается в создании новой коллекции уникальных генов родопсинов и ее патентовании для обеспечения собственной инструментальной базы для оптогенетических исследований в России.

Оптогенетика – сравнительно новое направление медицины на стыке генной инженерии, физиологии и биофизики. Метод основан на применении светоактивируемых белков, канальных родопсинов, которые способны модулировать мембранный потенциал в зависимости от освещения и при экспрессии в клетках-мишенях вызывают возбуждение или торможение нервного импульса. Одним из основных препятствий для развития оптогенетики остается острый недостаток генов родопсинов с нужными характеристиками, доступных для исследователей. Эти уникальные гены обнаружены в нескольких видах зеленых (*Chlorophyta*) и криптофитовых (*Cryptophyta*) водорослей, геномы которых до сих пор мало изучены.

МАТЕРИАЛЫ. Коллекция водорослей *Chlorophyta* кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ; образцы эндемичных водорослей *Cryptophyta* Белого и Черного морей. Ресурсы с открытым доступом – базы данных транскриптомов MMETSP 1091, 1389; базы данных NCBI.

РЕЗУЛЬТАТЫ. На основании анализа гомологии последовательностей генов канальных родопсинов мы разработали ПЦР-тесты для идентификации этих генов.

Родопсины катионных каналов, CCR. При ПЦР-анализе коллекции *Chlorophyta* были обнаружены и частично охарактеризованы два гена CCR в микроводоросли *Haematococcus lacustris* NAMSU-BM7-98/15, включая ранее неизвестный, 98CCR2. Также нам впервые удалось идентифицировать гены CCR в водорослях рода *Bracteacoccus aggregatus* NAMSU-BM5-34/15, один из которых, 34CCR, был проанализирован более детально. По результатам 3D-моделирования (SWISS-MODEL), кодируемые полипептиды 98CCR2 и 34CCR содержат все 7 консервативных доменов сенсорных родопсинов и однозначно идентифицируются как таковые.

Родопсины анионных каналов, ACR, обнаружены только в микроводорослях *Cryptophyta*. Нам удалось идентифицировать 2 новых гена в эндемичных изолятах – природном образце *Rhodomonas* sp из Белого моря и в обогащенной культуре черноморского изолята *Cryptomonas* из коллекции ИМБИ РАН, Севастополь. Фрагменты генов, *RhACR* и *CrACR*, соответственно, кодируют открытые рамки считывания, гомологичные *ACR Rhodomonas* sp (56 % и 92 % идентичности).

Основным препятствием для поиска генов *ACR* оказалось то, что ввиду трудности (или невозможности) культивирования *Cryptophyta* материалом для работы являются природные или обогащенные образцы высокой геномной сложности. В таких условиях эффективность ПЦР-анализа значительно снижается, поэтому для поиска уникальных родопсинов анионных каналов мы будем применять метагеномные методы исследования природных образцов. Таким образом, для создания коллекции генов родопсинов понадобится сочетать методы анализа *in silico* и ПЦР-тестирование с массивированным секвенированием геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-29-25050мк).

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДОННЫХ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В КРУГЛОГОДИЧНОМ ПОЛЕВОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ В УСЛОВИЯХ ЯПОНСКОГО МОРЯ

Волченко Н. Н.¹, Лазукин А. А.¹, Масленников С. И.², Самков А. А.¹, Худокормов А. А.¹

¹Кубанский государственный университет, Краснодар, microgenbio@kubsu.ru

²Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, nscmb@mail.ru

Микробные топливные элементы (МТЭ) являются перспективными биотехнологическими устройствами, в которых способность анодышащей микрофлоры используется для получения маломощной электрической энергии, биodeградации органических субстратов, для детекции и ассимилируемых микробами веществ. Одним из активно развивающихся в ряде стран направлений, является исследование так называемых бентосных или донных МТЭ, функционирующих за счёт биоэлектрохимической активности естественных микробных сообществ, присутствующих в донных осадках водоёмов. В ряде зарубежных исследований показана возможность функционирования донных МТЭ в условиях южных морей, однако для российских условий такие работы отсутствуют. Целью нашего исследования являлась оценка биоэлектрической активности естественных природных сообществ донных осадков залива Петра Великого Японского моря в круглогодичном эксперименте.

Эксперимент проводился с установкой из 16 микробных топливных элементов, погруженных на глубину 2 м на биостанции «Запад» Национального центра морской биологии ДВО РАН в бухте Тихая заводь. Данные по уровню напряжения в каждом МТЭ, температуре воды и другим параметрам передавались автоматически в облачное хранилище с частотой 30 минут на протяжении более 12 месяцев. Количество биоплёнки на аноде измеряли фотометрически с помощью BSA Protein Assay Kit.

По итогам годового эксперимента было показано, что биоэлектрохимическая активность бентосной микробиоты, коррелируя с температурой придонного слоя воды минимальна с января по март, колебаясь в диапазоне 0–10 мВ. В апреле начинается постепенный рост

электрогенеза до 20–40 мВ, с мая он возрастает на порядок до 200–300 мВ с пиковым периодом в июле. К сентябрю биоэлектрохимическая активность постепенно снижалась до весенних значений. Было показано, что внесение в бентосный слой углеводов и кадмия в качестве токсикантов кратно уменьшало выход электричества, что показывает возможность применения подобных систем в режиме биосенсоров на химическое загрязнение донных осадков. Количественный анализ белка микробной биопленки анода также показал меньшие её величины в присутствии токсикантов.

МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ГОМЕОСТАЗА КЛЕТКИ ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *MARINOMONAS PRIMORYENSIS* И *YERSINIA RUCKERI*. В УСЛОВИЯХ МОРСКОЙ АКВАТОРИИ

Воронина О. Л., Кунда М. С., Аксенова Е. И., Рыжова Е. И., Романенко Л. А., Новикова О. Д.

¹НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, info@gamaleya.org
²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, science@piboc.dvo.ru

Введение. Протеобактерии – самые многочисленные и разнообразные представители бактерий в морских акваториях, способные адаптироваться не только к природным условиям, но и к загрязнениям, неизбежным в техногенном обществе.

Цель. Выявление механизмов поддержания гомеостаза психротолерантных гамма-протеобактерий, принадлежащих порядкам Enterobacteriales и Oceanospirillales на примере *Yersinia ruckeri* и *Marinomonas primoryensis*, выделенных в начале 2000-х годов из окраинных морей западной части Тихого океана (Охотского и Японского).

Материалы и методы. Геномы *M. primoryensis* KMM3633 и *Y. ruckeri* KMM821 секвенировали на платформах MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore), собирали с помощью программ CLC Genomic Workbench v. 12 / 20 и SPAdes ver.3.13.0, аннотировали на основе сервера RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) и дополнительных биоинформационных ресурсов. GenBank Accession Number CP054301 и CP071802-CP071804.

Результаты и обсуждение. Поддержание гомеостаза обеспечивает комплекс механизмов. Секретируемый белок-антифриз *M. primoryensis* (MP) предотвращает рост кристаллов льда вокруг клетки. Текучесть клеточных мембран контролируют продукты генов биосинтеза жирных кислот и оперона ABC транспортера гамма-аминоасляной кислоты. За проницаемость внешней мембраны MP отвечает единственный порин суперсемейства Porin_4. Геном *Y. ruckeri* (YR) кодирует 9 поринов (в основном OmpC семейства). Уменьшение числа поринов ограничивает пассивную диффузию. Внутренняя мембрана поддерживает гомеостаз посредством регулируемых активных транспортеров, использующих энергию гидролиза АТФ (ABC транспортеры, преобладающие у YR (168)) или градиент концентрации ионов (TRAP/TAXI-, TTT-транспортеры, отличающие MP (27)).

Внутри клеток в условиях низких температур важна роль трегалозы и ее производных, синтезируемых и транспортируемых MP и YR. Трегалоза обладает высоким числом гидратации, что обеспечивает защиту клетки от образования льда при отрицательных температурах. В тоже время белки холодового шока CSP (10 у YR и 6 у MP), являясь ингибиторами репликации бактериальной ДНК, способствуют снижению метаболизма клетки в этих условиях.

Выводы. Разнообразные механизмы поддержания гомеостаза способствуют выживанию протеобактерий в морской акватории в условиях техногенных изменений.

Грант РФФИ № 19-04-00318

МИНЕРАЛЬНЫЕ ПОДЗЕМНЫЕ ВОДЫ КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ И ИСТОЧНИК ВЫДЕЛЕНИЯ НОВЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ И ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ «РАЗРЕЖЕННОЙ БИОСФЕРЫ»

Гаврилов С. Н.¹, Маслов А. А.², Ключкина А. А.¹, Меркель А. Ю.¹, Заварзина Д. Г.¹

¹Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Геологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Месторождения питьевых минеральных подземных вод представляют собой один из наиболее ценных и востребованных природных ресурсов. Решение проблем генезиса и сохранения этих ресурсов при их эксплуатации невозможно без оценки биогеохимической активности микробных сообществ, населяющих подземную гидросферу. Характеристика микробных сообществ водоносных горизонтов зоны активного водообмена важна для понимания функционирования подземных биоценозов, в целом, так как эти экосистемы гидравлически открыты, и формирование их естественных ресурсов идёт, в том числе, при участии атмосферных осадков, т.е. во взаимодействии с поверхностной биосферой. Предположения о значительном влиянии микроорганизмов на состав минеральных подземных вод возникли на протяжении всей истории изучения их генезиса, но микробиологические исследования в этой области до сих пор были фрагментарны.

Наша работа посвящена характеристике микробных сообществ минеральных вод, добываемых на Ессентукском месторождении. Профилирование по гену 16S рРНК микробных сообществ вод шести скважин, вскрывающих различные водоносные горизонты, выявило их существенные отличия друг от друга по филогенетическому составу, что говорит об изолированности эксплуатируемых горизонтов месторождения. В то же время, все исследованные микробные сообщества имели ряд общих характерных черт. В каждом из них преобладали филотипы, не имеющие культивируемых представителей, например, археи филума *Nadarchaeales*, или актинобактерии новых семейств и классов. Значительную долю разнообразия составляли филотипы, культивируемые представители которых способны к автотрофному метаногенезу или ацетогенезу, либо к внеклеточному переносу электронов. Широкое разнообразие последних было выявлено среди минорных компонентов сообществ, каждый из которых составлял менее 1 % всей популяции.

Общий вклад таких малочисленных популяций в геохимическую активность сообществ может быть существенным. Нам удалось подтвердить это предположение, выделив чистые культуры микроорганизмов двух «микроразнообразий» – железоредукторов р. *Deferribacter* и железooksисляющих бактерий р. *Halothiobacillus*. Нами были также получены чистые культуры доминирующих групп архей р. *Methanothermobacter* и актинобактерий филотипа ОРВ41 класса *Coriobacteriia*, для которого впервые была показана способность к железоредукции. Геном представителя ОРВ41 был секвенирован и аннотирован, его дальнейший детальный анализ позволит пролить свет на метаболизм новой культивируемой группы прокариот.

Полученные данные создают основу для дальнейшего подробного изучения микробиологического фактора в генезисе минеральных подземных вод.

НОВЫЕ ШТАММЫ *LACTOBACILLUS* С АНТАГОНИСТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Гаврилова Е. А., Анисимова Е. А., Каюмов А. Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Alalila@yandex.ru

Лактобациллы широко используются в различных биотехнологических процессах. Данные микроорганизмы обладают способностью подавлять рост других бактерий, в том числе и патогенных, за счет продукции органических кислот, перекиси водорода и бактериоцинов.

Нами были выделены из силоса более 200 штаммов молочнокислых бактерий, из которых 6 проявляли высокую степень антагонизма с условно-патогенными бактериями. Все

бактерии были идентифицированы как *Lactobacillus plantarum* или *Lactobacillus fermentum* на основе последовательности гена 16SpPHK. Целью работы было охарактеризовать степень антагонистических свойств новых штаммов лактобацилл в отношении микроорганизмов в составе биоплёнки, а также в модельных условиях кислomолочного сбраживания молока и способность сохранять антагонистический потенциал после высушивания при воздействии высоких температур.

Лактобациллы засеивали совместно с *K.pneumoniae*, *E.coli* и *S.aureus* на среду MRS, а также вносили к биоплёнке, и через 2 суток культивирования оценивали жизнеспособность клеток путем подсчета КОЕ. Все штаммы лактобацилл подавляли рост патогенов при концентрации глюкозы 2,5 % и частично сохраняли антагонистических свойств в биоплёнке. При 0,25 % глюкозы антагонизм наблюдался только в биоплёнке.

Был выбран штамм, проявивший лучшую антагонистическую активность – AG10. Чтобы охарактеризовать антагонистическую активность штамма AG10 с *E.coli* и *S.aureus* в молоке, моделировали условия кислomолочного брожения. Далее на 1, 3, 7, 21-ые сутки производили подсчет КОЕ и измеряли pH среды. Было показано подавление штаммом лактобацилл клеток *E.coli*.

Далее оценивали антагонистическую активность лактобацилл, выращенных в послеспиртовой барде и молочной сыворотке и подвергнутых температурному воздействию 50, 55, 60 и 65 °C, против *S.aureus* и *E.coli*. Лактобациллы, выращенные в молочной сыворотке, сохраняют свои антагонистические свойства при более высоких температурах, нежели выращенные в послеспиртовой барде.

Таким образом, новый штамм лактобацилл представляет интерес для использования в сельскохозяйственной и молочнокислой промышленности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 20-016-00025 А.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ F_0F_1 -АТФ-СИНТАЗЫ *INH1* И *STF1* В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Галкина К. В.^{1,2*}, Маркова О. В.², Кашко Н. Д.¹, Зубарева В. М.¹, Лапашина А. С.^{1,2},
Фенюк Б. А.^{1,2}, Кнорре Д. А.^{1,2}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

² НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

*galkinakseniia@gmail.com, +79859952260

Микроорганизмы проводят большую часть времени в состоянии покоя. Скорость их выхода из покоящегося состояния при появлении в среде питательных субстратов является важным адаптивным признаком. При этом первые внутриклеточные реакции, необходимые для утилизации появившегося в среде субстрата, могут быть сопряжены с затратами энергии. Следовательно, даже в условиях длительного голодания микроорганизмы должны избегать ситуации полного истощения в них АТФ. Мы предположили, что в случае эукариотических микроорганизмов – пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – важную роль в сохранении клеточного АТФ в условиях голодания будут играть ингибиторы F_0F_1 АТФ-синтазы *Inh1p* и *Stf1p*. Известно, что эти белковые факторы препятствуют гидролизу АТФ в условиях сильного снижения трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий. Чтобы проверить свое предположение, мы получили штамм дрожжей *Δinh1Δstf1* и исследовали в нем динамику роста культуры клеток после длительного голодания. Делеция генов *INH1* и *STF1* препятствовала возобновлению роста клеток на среде с глюкозой после голодания. Этот эффект усиливался добавлением протонофоров (пентахлорофенол, FCCP). С помощью точной цитометрии и флуоресцентной микроскопии мы показали, что концентрация *Inh1-GFP* увеличивается в стационарной фазе роста. При этом при переходе от роста на среде с сбраживаемым источником углерода к голоданию наблюдается гетерогенность клеток дрожжей по содержанию ингибитора АТФазы *Inh1p*. Кроме того, клетки дрожжей *Δinh1Δstf1* не были способны поддерживать высокую скорость дыхания в присутствии протонофоров. Мы

предполагаем, что Inh1p и Stf1p препятствуют гидролизу АТФ деэнергизованными митохондриями, что позволяет сохранить АТФ для реакций «верхнего» гликолиза при переходе дрожжевых клеток от голодания к активному росту.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-14-00268.

УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМА SHEWANELLA ONEIDESIS MR-1 К НЕКОТОРЫМ ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

Гасюк О. А.*, Волченко Н. Н., Лазукин А. А., Самков А. А., Худокормов А. А.,
Шаталина Е. С.

Кубанский государственный университет, Краснодар, microgenbio@kubsu.ru

* lelya.gasyuk@mail.ru

Микроорганизмы рода *Shewanella* являются одними из перспективных биотехнологических агентов – за счёт эффективных цепей переноса электронов, способности к анаэробному дыханию, они применяются в биоремедиации тяжелых металлов (ТМ), органических поллютантов, в микробных топливных элементах (МТЭ) и др. Целью работы было изучение устойчивости штамма *S. oneidensis* MR-1 к катионам свинца, никеля и меди, а также их влияние на биоэлектрогенез МТЭ, инокулированных шеванеллой.

Исследуемым микроорганизмом являлся штамм *S. oneidensis* MR-1, полученный из ВКПМ (№ В-9861). Бактерии культивировались на питательном агаре и жидкой минеральной среде с сахарозой. Соли ТМ вносились в среды в трёх концентрациях, соответствующих описанным в литературе уровням загрязнения бассейнов Чёрного и Японского морей: Pb^{2+} – 1, 6, 12 ПДК, Ni^{2+} – 1, 7, 14 ПДК, Cu^{2+} – 3, 14, 28 ПДК. Использовали безмембранные МТЭ бентосного типа с вертикальным расположением электродов на основе углеродного войлока “Карбопон”. Биоэлектрогенез оценивали по уровню напряжения, регистрируемого автоматическим вольтметром авторской конструкции.

Эксперимент проводился в 3 этапа – последовательно изучали устойчивость штамма при росте на плотной питательной среде с ТМ, в жидкой среде с аналогичными их концентрациями и в микробных топливных элементах. Обнаружено, что на питательном агаре штамм *S. oneidensis* MR-1 оказался наиболее устойчив к свинцу – уже в первые сутки рост был отмечен при всех уровнях концентраций металла. Никель и медь оказались более токсичными – биомасса наблюдалась при – 1 ПДК для Ni^{2+} и 3 ПДК для Cu^{2+} . Через 5 суток отмечали рост бактерий только при 3 ПДК для Ni^{2+} , что может свидетельствовать об адаптации бактерий.

Активность роста в жидких средах оценивалась по оптической плотности (ОП) бактериальных суспензий при длине волны 670 нм на протяжении 5 суток. Были получены сходные с предыдущим этапом результаты – рост ОП был отмечен только в средах со Pb^{2+} – 1, 6, 12 ПДК, максимальные ОП составили 0,099, 0,042 и 0,014 усл. ед. соответственно. В контроле без присутствия ТМ – 0,251 усл. ед. Контрольный высев с жидкой среды на плотную с аналогичными концентрациями ТМ показал сохранение жизнеспособности штамма со Pb^{2+} и Ni^{2+} , гибель клеток в среде с Cu^{2+} . В МТЭ тяжёлые металлы были внесены в концентрации 7 ПДК. В результате средние уровни напряжения составили для Cu^{2+} – 85,56, Ni^{2+} – 116,93 и Pb^{2+} – 170,18 мВ на протяжении первых трёх суток опыта. Что свидетельствует о сохранении жизнеспособности культуры в присутствии Pb^{2+} и её угнетение с катионами Cu^{2+} .

В результате исследования показана убыль токсического эффекта для *S. oneidensis* MR-1 в ряду $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+}$, электрогенез МТЭ в присутствии различных ионов ТМ увеличивается аналогично вышеуказанному ряду – 85,56 > 116,93 > 170,18 мВ.

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НЕФТИ НА ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Глинская Е. В., Дементьева Н. А., Петерсон А. М., Нечаева О. В., Успанова Д. М.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н. Г. Чернышевского

Саратовский государственный технический университет им. Ю. А. Гагарина
* elenavg-2007@yandex.ru

Введение и цель работы.

Нефть и нефтепродукты являются одними из самых распространенных веществ, загрязняющих окружающую среду. Нефть наносит непоправимый вред экосистемам, зачастую приводя к настоящим экологическим катастрофам. Проблема нефтезагрязнения актуальна и для Саратовской области, на территории которой имеются нефтеперерабатывающие заводы, нефтесклады, нефтепроводы и другие объекты. Цель работы – оценка токсического действия нефти на основные группы почвенных микроорганизмов.

Материалы и методы.

Работа проводилась на базе кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н. Г. Чернышевского, кафедры экологии и техносферной безопасности СГТУ имени Ю. А. Гагарина. Для исследования использовали почву подтипа чернозем южный, отобранную в окрестностях лесополосы села Синенькие Саратовского района Саратовской области. Для загрязнения почвы в лабораторных условиях использовали нефть Соколовогорскую светлую. Для оценки токсического действия нефти определяли численность гетеротрофных бактерий, нитрифицирующих бактерий, плесневых грибов и актиномицетов. Измерение массовой доли нефтепродуктов в образцах почвы проводили по стандартной методике с помощью ИК-спектрометрии.

Результаты и обсуждение.

Микробиологические исследования показали, что численность гетеротрофных бактерий и плесневых грибов достигали максимума к 30-м суткам. Пик численности актиномицетов и нитрифицирующих бактерий наблюдался в период с 30-х по 60-е сутки. Из почвы выделено и идентифицировано 63 штамма гетеротрофных бактерий, которые были отнесены к 3 родам и 10 видам. Большая часть выделенных гетеротрофных бактерий принадлежала к роду *Bacillus*. Также было выделено по одному виду родов *Micrococcus* и *Serratia*. Наиболее высокие количественные показатели отмечались у видов *B. mojavensis* и *B. megaterium*. Самые низкие показатели были характерны для видов *B. circulans*, *B. niacini*, *B. simplex* и *Serratia plymuthica*. При изучении диапазона выживаемости выделенных бактерий к нефтезагрязнению было выявлено, что большинство видов способны выдерживать концентрацию нефти 5 и 10 %. Для изучения способности использовать нефть в качестве единственного источника углерода микроорганизмы культивировали на безуглеродной среде М9 с добавлением различных концентраций поллютанта. Было установлено, что при концентрации нефти не более 5 % наиболее перспективными нефтедеструкторами могут быть бактерии *B. mojavensis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*. При увеличении содержания нефти в среде ее успешную деструкцию может осуществлять только вид *Micrococcus luteus*. В результате деятельности микробиоты почвы подтипа чернозем южный массовая концентрация нефтепродуктов в исследуемых образцах за 180 суток снизилась на 43 %.

Заключение.

Проведенное комплексное изучение бактерий, выделенных из образца нефтезагрязненной почвы, открывает перспективы использования выделенных видов в качестве нефтедеструкторов.

ПЕРВАЯ ОБЛИГАТНО АВТОТРОФНАЯ АЦЕТОГЕННАЯ БАКТЕРИЯ *ACETICELLA AUTOTROPHICA*

Гололобова А. В.^{1,2,*}, Лебединский А. В.², Ельченинов А. Г.², Кубланов И. В.^{1,2},
Фролов Е. Н.²

¹Кафедра микробиологии, Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Фундаментальных основ
биотехнологии РАН, Москва
* sasha.gololobova@yandex.ru

Ацетогенные бактерии – это микроорганизмы, которые в ходе анаэробного дыхания продуцируют молекулу ацетата из двух молекул CO₂ через путь Вуда-Льюнгаля. Все известные на данный момент ацетогенные бактерии являются факультативными автотрофами или облигатными гетеротрофами, но это не исключает вероятность существования облигатно автотрофных ацетогенов. Целью данной работы является полная физиологическая и филогенетическая характеристика первой облигатно автотрофной ацетогенной бактерии.

Из проб осадков термального источника Каскадный кальдеры Узон (Камчатка) с использованием модифицированной среды Пфеннига при 50 °С и pH 6,0 был выделен штамм 3443-3Ac. Данный штамм рос в хемолитоавтотрофных условиях с H₂ в качестве донора электронов и CO₂ в качестве источника углерода и акцептора электронов. Единственным продуктом метаболизма являлся ацетат. Новый изолят был способен к росту на формиате и на СО (в присутствии формиата или H₂), а также восстанавливал S⁰ или тиосульфат в присутствии H₂ или формиата. Новый изолят не был способен к росту на органических субстратах, среди которых были проверены сахара, органические кислоты, спирты, белки, метоксилированные ароматические соединения. Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов 16S рПНК, показал, что штамм 3443-3Ac относится к гетерогенной группе *Thermoanaerobacterales* Family III внутри филума *Firmicutes*. Наиболее близкими к новому изоляту оказались представители рода *Thermoanaerobacterium* – сходство последовательностей генов 16S рПНК на уровне 93–94 %. Для более надежного нахождения филогенетического положения штамма 3443-3Ac был проведен филогенетический анализ, основанный на конкатенированных последовательностях 120 консервативных белков. Оба филогенетических дерева показывали, что новый изолят образует ветку, четко отделенную от ближайших родственников. На основании представленных выше результатов нами был предложен новый род *Aceticella* с типовым видом *Aceticella autotrophica*.

Таки образом, в ходе проделанной работы дана полная физиологическая характеристика первой облигатной автотрофной ацетогенной бактерии *A. autotrophica*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-14-00242.

Ультроструктурные АНОМАЛИИ ГЕТЕРОЦИСТ *NOSTOC SP. PSS 7120* РИ КОЛЕБАНИЯХ СОДЕРЖАНИЯ ФОСФОРА В СРЕДЕ ОБИТАНИЯ

Горелова О. А.* , Баулина О. И., Семенова Л. Р., Селях И. О., Лобакова Е. С.

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru
*ogo439@mail.ru

Известно, что синтез и активность нитрогеназы, ключевого фермента фиксации молекулярного азота (N), и ряда функционально сопряженных с ней белков, за редкими исключениями, возможны только в микроаэробных условиях. Такие условия в аэробной среде обитания обеспечиваются в гетероцистах (Гц) за счет прекращения работы фотосистемы II, повышения респираторной оксидазной активности и синтеза не проницаемой для кислорода оболочки. Формирование, распределение в трихоме и функционирование Гц зависят от обмена между клетками в трихоме регуляторами, сигнальными молекулами и метаболитами. Обмен обу-

словлен непрерывным периплазматическим пространством трихома, транспортерами в цитоплазматической мембране и септальными межклеточными соединениями. Цель работы – изучение ультраструктуры Гц при различной доступности фосфора.

Исследовали нитчатую diaзотрофную цианобактерию *Nostoc* sp. PCC 7120, растущую в стеклянных колоннах при непрерывном освещении (120 мкмоль фотонов/(м²·с) ФАР) и продувании смесью CO₂: воздух (1:50, об./об.) последовательно на минеральной среде BG-11₀ (без N), модифицированных средах BG-11_L (без N и P) и BG-11_{HP} (без N с повышенным относительно BG-11₀ в 4.5 раза содержанием P). Основные методы – световая и электронная микроскопия.

При истощении P в популяции сокращалось количество Гц типичной структуры; выявлялись Гц с аномальной оболочкой (без гликолипидного слоя, с фрагментированным внутренним и разреженным внешним полисахаридными слоями) или с полным ее отсутствием. В пептидогликановом (Пг) слое клеточной стенки Гц возникали пустоты. Обнаружены также диплетные Гц и парные Гц в одной оболочке со всеми сохранными слоями клеточной стенки и оболочки. После внесения P в среду культивирования такие аномальные Гц сохранялись не менее 2-х недель. Более того, появлялись триплеты Гц и диплеты Гц из пар в одной оболочке. При культивировании в BG-11₀ на продольных ультратонких срезах регулярно выявлялись септальные соединения (до 10 наносом). Отсутствие P (в среде BG-11_L) вызвало нарушения дивисом, септальный Пг расслаивался, септальные соединения обнаруживались редко и были атипичны. При возобновлении источника P (среда BG-11_{HP}) септальные Пг и соединения восстанавливаются, как и частота типичных гетероцист.

Выявленные нами аномалии оболочек Гц, мультиплетные Гц и парадоксальные парные Гц в одной оболочке – ультраструктурные индикаторы нарушений экспрессии генов каскада дифференцировки Гц на стадии про-Гц, и снижения латерального ингибирования дифференцировки Гц в соседних клетках. Последнее, очевидно, обусловлено аномалиями септальных соединительных комплексов при дефиците фосфора в diaзотрофных условиях.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ НА ДЕФИЦИТ ФОСФОРА ДВУХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В НЕДИАЗОТРОФНЫХ УСЛОВИЯХ

*Горелова О. А.**, *Селях И. О.*, *Семенова Л. Р.*, *Щербаков П. Н.*, *Чивкунова О. Б.*,
Баулина О. И., *Соловченко А. Е.*, *Лобакова Е. С.*

МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru
*ogo439@mail.ru

Цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7118 (далее в тексте PCC 7118) и *Nostoc* sp. PCC 7120 (далее в тексте PCC 7120) – близкородственные штаммы: первый – короткоцепочечный мутант азотфиксирующего PCC 7120, утративший способность к дифференцировке гетероцист (Гц) (Rippka, 1988). Отсутствие связанного азота в среде приводит к гибели PCC 7118, отсутствие фосфора (P) является стресс-фактором, ограничивающим жизнедеятельность обеих культур. Цель работы – сравнение морфофизиологической реорганизации этих штаммов при отсутствии экзогенного фосфора в условиях, не индуцирующих дифференцировку гетероцист.

Цианобактерии выращивали в стеклянных колоннах при непрерывном освещении (120 мкмоль фотонов/(м²·с) ФАР) и продувании смесью CO₂: воздух (1:50, об./об.) последовательно на минеральной среде BG-11 и на модифицированной среде BG-11_M (без P). Основные методы – оптическая спектроскопия поглощения, световая и электронная микроскопия, морфометрия на ультратонких срезах.

Кинетика роста штаммов (по клеточной плотности, содержанию хлорофилла, весу сухой биомассы) на среде BG-11 значительно не различалась. Однако при переносе культур на среду BG-11_M уже с первых суток у PCC 7118 трихомы укорачивались с максимальных 40 клеток до 8-18 клеток, тогда как у PCC 7120 трихомы оставались длинными (до 100–150 клеток). Клеточные деления и прирост биомассы на среде без P прекращались к 9–11 суткам в куль-

туре РСС 7118 и на несколько суток позже – в культуре РСС 7120, которая сохраняла жизнеспособность в этих условиях не менее месяца. В культурах обоих штаммов снижалось содержание пигментов, причем у РСС 7118 хлороз прогрессировал быстрее, чем у РСС 7120. Кроме того, у РСС 7118 фикобилины сокращались быстрее, чем хлорофилл, а у РСС 7120 содержание всех пигментов изменялось почти синхронно. Ультраструктурную реорганизацию оценивали по частоте выявления, площади и количеству на срезах клеток карбоксисом (Кс), гранул гликогена (α Г), полифосфатов (Пф), цианофицина (ЦГ), полигидрокси- β -бутирата (ПГБ), липидов (β Г), а также по обилию рибосом (Р), размерам нуклеоидных зон (Н) и фикобилисом (Фс), количеству тилакоидов (Т) и их протяженности. На фоне кратного снижения параметров Кс, α Г, Пф, ПГБ, Р, Н, Т и Фс, вплоть до полного исчезновения α Г, Пф, ПГБ, регистрировали гипернакопление ЦГ. В целом реакция на фосфорное голодание была значительно интенсивнее у РСС 7118, чем у РСС 7120. Так, у РСС 7118 регистрировали снижение доли Кс и повышение доли ЦГ в площади протопласта в 12,5 и 75 раз, а у РСС 7120 – только в 5 и 27 раз, соответственно.

Показанное различие штаммов по устойчивости к фосфорному голоданию, возможно, обусловлено их разной способностью к внутриклеточному резервированию полифосфатов при росте на среде BG-11 в отсутствие лимитирующих факторов: в этих условиях у РСС 7120 выявлено на порядок больше структур, идентифицированных как гранулы Пф, чем у РСС 7118. Это позволяет предположить, что разница между исследуемыми штаммами не ограничена их способностью к дифференцировке Гц.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-29-25050мк) с использованием оборудования ЦКП МГУ им. М. В. Ломоносова.

НОВЫЕ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ЛАБОРАТОРНОГО БИОРЕАКТОРА, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩЕГО УДАЛЕНИЕ ФОСФОРА

Груздев Е. В., Белецкий А. В., Пелевина А. В., Дорофеев А. Г., Грачев В. А.,
Пименов Н. В., Равин Н. В., Марданов А. В.*

*ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
gruevg@yandex.ru

Очистка коммунальных сточных вод от фосфатов, поступление которых в водоемы нарушает сбалансированность этих экосистем и вызывает процессы эвтрофикации, является важной практической задачей. В настоящее время для этого применяются биотехнологии, основанные на использовании фосфат-аккумулялирующих микроорганизмов (ФАО), «собирающих» неорганические фосфаты из среды и включающих их в свою биомассу в виде полифосфатов при циклическом росте в анаэробных и аэробных условиях. ФАО развиваются в составе сложных микробных сообществ, а наиболее значимые из них, представители рода *Ca. Accumulibacter*, до настоящего времени не выделены в чистые культуры.

Целью работы была характеристика ФАО в микробном сообществе активного ила лабораторного биореактора, осуществляющего удаление фосфора. В результате метагеномного анализа получено 73 генома (MAG) представителей филумов *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Mycococcota*, *Patescibacteria*, *Proteobacteria* и *Spirochaetota*. Доминировали представители филума *Proteobacteria*, среди которых были обнаружены ФАО родов *Ca. Accumulibacter*, *Dechloromonas* и *Thiothrix*. Анализ генов полифосфат киназ выявил еще три новых потенциальных ФАО из семейства *Rhodocyclaceae*, что также подтверждается анализом их геномов, содержащих набор характерных для ФАО генов. На основе анализа геномов были реконструированы пути метаболизма, в том числе синтеза и деградации полигидроксиалконатов и полифосфатов.

Полученные данные создают основу для совершенствования биотехнологий удаления фосфора из сточных вод за счет инженерии ФАО-консорциумов. Работа поддержана грантом РНФ 21-64-00019.

АНАЛИЗ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ОРИГИНАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ДРОЖЖАХ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ МАССОВОГО СКРИНИНГА МУТАНТОВ И АНАЛИЗА ПРОТЕОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Эслам Ш. Гhazi^{1,2,3*}, Станишевский Я. М.¹, Макаров В. А.², Александров А. И.²

¹Институт бионанотехнологий РУДН, Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А. Н. Баха, Москва

³Кафедра микробиологии, фармацевтический факультет, Университет Танта, Египет

*eslam_ghazy@pharm.tanta.edu.eg

Высокие показатели смертности от инвазивных грибковых инфекций, токсичность некоторых имеющихся противогрибковых препаратов, а также постоянно возникающие лекарственно-устойчивые формы грибковых патогенов создают острую потребность в новых противогрибковых препаратах. Существует ряд веществ, для которых продемонстрирована антимикотическая активность, однако не изучен механизм действия. Вместе с тем, исследование механизма действия является нетривиальной научной задачей. Один из возможных подходов – это поиск генов, нарушение или сверхпродукция которых вызывает устойчивость или чувствительность к веществу. При этом, проведение такого рода поиск в модельных грибах, например дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, является значительно более простым, и вместе с тем эффективным методом.

В данной работе мы провели предварительную работу для проведения исследований механизма действия 4 новых соединений, для которых ранее была продемонстрирована антимикотическая активность – соединения (# 9926061), (# 11326083), (# 10026149), (# 110260149).

Используя штамм *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, были проведены предварительные тесты для подбора условий – определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Кроме того было исследовано, приводят ли исследуемые препараты к эффективной гибели клеток.

Результаты тестов на определение МИК показали, что значения для (# 9926061, МИК = 5 мкг/мл), (# 11326083, МИК = 15,5 мкг/мл), (# 10026149, МИК = 2,5 мкг/мл), (# 110260149, МИК = 10 мкг/мл). Эти значения в основном были значительно выше, чем значения для амфотерицина В (MIC = 0,366 мкг/мл), флуконазола (15,6 мкг/мл), микафунгина (MIC < 0,1 мкг/мл), нистатина (MIC = 3,1 мкг/мл), однако это не является существенной проблемой, т.к. предлагаемые вещества могут быть доработаны после получения более полных сведений о механизме их действия. Также мы показали, что среди исследуемых веществ только # 9926061 обладает заметной фунгицидной активностью. Наши исследования будут продолжены с использованием протеомного и геномного подходов для характеристики механизмов действия этих соединений.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-10115.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ SPYCAS9 НУКЛЕАЗ С ПОВЫШЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДНК В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Давлетшин А. И.^{*}, Спасская Д. С., Тютяева В. В., Гарбуз Д. Г., Карпов Д. С.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Москва

*artem.dav7@yandex.ru

Редактирование геномов (внесение желаемых изменений в определенные локусы геномной ДНК) имеет огромное значение как для фундаментальной науки, так и для практических приложений: медицины и биотехнологии. В настоящее время наиболее простой и удобной системой редактирования геномной ДНК является система CRISPR/Cas9 (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR associated protein – CRISPR-ассоциированный белок) из *Streptococcus pyogenes*. Однако система имеет ряд недостатков, один из которых – довольно высокая неспецифичная активность нуклеазы SpyCas9. Это ограничивает ее применение в генной терапии наследственных заболеваний.

Целью нашей работы было получение новых вариантов SpyCas9, обладающих как повышенной (относительно SpyCas9 дикого типа) специфичностью, так и активностью. Для получения новых форм мы комбинировали аминокислотные замены, для которых было показано положительное влияние на специфичность редактирования ДНК. Также с помощью метода «эволюции в пробирке» была получена мутация, повышающая активность высокочастотных SpyCas9 нуклеаз, но не снижающая специфичность редактирования ДНК.

Для оценки активности и специфичности вариантов SpyCas9 нами была создана тест-система на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и гена-мишени *ADE2* (Phosphoribosyl aminoimidazole carboxylase), который участвует в биосинтезе аденина. В данной тест-системе активность вариантов SpyCas9 оценивалась по соотношению дрожжевых колоний, окрашенных в красный цвет вследствие SpyCas9-опосредуемого нокаута гена *ADE2*.

На первом этапе работ нами был получен набор из 35 вариантов белка SpyCas9, из которых были выбраны несколько форм, проявляющих наибольшую активность. Полученные новые варианты белка SpyCas9 продемонстрировали высокую специфичность (в 10 раз большую по сравнению с диким типом) без значительного ущерба для целевой активности редактирования ДНК. Также был получен производный вариант, обозначенный нами как НураCas9-DE-LP, активность которого оказалась сопоставимой с таковой у белка дикого типа, при значительно более высокой специфичности редактирования ДНК.

Полученные нами высокоспецифичные и высокоактивные варианты SpyCas9 могут служить перспективными кандидатами для дальнейшего улучшения технологии редактирования генома.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-07015.

ЛИПИДНЫЙ И ОСМОЛИТНЫЙ ПРОФИЛЬ АЛКАЛОФИЛЬНОГО МИКРОМИЦЕТА *SODIOMYCES ALKALINUS* В ПРОЦЕССЕ ЦИТОДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Данилова О. А.¹, Козлова М. В.², Януцевич Е. А.¹, Камзолкина О. В.³,
Терёшина В. М.¹

¹Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, info@fbras.ru

²Государственный океанографический институт им. Н. Н. Зубова, Москва, adm@oceanography.ru

³МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru
Olga.a.danilova@bk.ru

S. alkalinus – алкалофильный аскомицет, выделенный из прибрежных почв содовых озер России, Монголии и Танзании, для которых характерен высокий уровень pH (≥ 10) Механизмы, позволяющие алкалофильным грибам выживать в гиперщелочных условиях, основа-

ны на поддержании мембран и макромолекул в функциональном состоянии за счет изменения состава липидов и осмолитов (растворимых углеводов и полиолов). Другим механизмом переживания неблагоприятных условий у *S. alkalinus* является образование замкнутых плодовых тел с покоящимися аскоспорами.

Цель данной работы — изучение состава мембранных липидов и осмолитов в мицелии и в плодовых телах *S. alkalinus*.

Осмолиты экстрагировали горячей водой, очищали от белков и заряженных соединений, анализировали в виде триметилсилильных производных методом ГЖХ с внутренним стандартом. Липиды экстрагировали по методу Николса и анализировали количественно методом ТСХ и денситометрии с использованием стандартных растворов. Жирные кислоты анализировали в виде метиловых эфиров методом ГЖХ.

В мицелии доминирующими углеводами были маннит (47–56 %) и трегалоза (38–49 %). В плодовых телах трегалоза являлась единственным доминирующим углеводом — её содержание повышалось в 2 раза до 75 %, что соответствует 8–10 % (масс.), на фоне резкого снижения уровня маннита.

Общее количество липидов составляло в мицелии 2,5–3 % (масс.), в плодовых телах — 1,1 % (масс.). Доминирующие мембранные липиды молодого мицелия были представлены фосфатидилхолинами (ФХ) (21 %), фосфатидными кислотами (ФК) (33 %), и стеринами (Ст) (19 %). С возрастом доли ФХ и Ст немного возрастали на фоне снижения доли ФК. В плодовых телах преобладали ФХ и Ст (по 37 %), тогда как ФК являлись минорным компонентом (6 %).

Основными жирными кислотами фосфолипидов были линолевая ($C_{18:2}$), олеиновая ($C_{18:1}$) и пальмитиновая ($C_{16:0}$). Степень ненасыщенности (СН) основных фосфолипидов мицелия (ФХ и ФК) с возрастом повышалась за счёт повышения доли $C_{18:2}$. СН ФХ в плодовых телах была сравнима с её значением в мицелии.

Основными запасными липидами в молодом мицелии были свободные жирные кислоты, а в зрелом мицелии и плодовых телах — триацилглицерины.

Полученные данные позволяют предположить следующие механизмы адаптации *S. alkalinus* к гиперщелочным условиям: 1) накопление ФК, небислойного фосфолипида, способствующего образованию микродоменов и изгибов мембран; 2) синтез цитопротекторного углевода трегалозы.

НОВЫЕ РУБЕЖИ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ, ОСНОВАННЫХ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Дедыш С.Н.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва
dedysh@mail.ru

Аэробные метанотрофные бактерии — это группа прокариот, специализированных на использовании метана в качестве источника углерода и энергии. Эта уникальная способность метанотрофов обуславливает их высокий биотехнологический потенциал. Микробная конверсия метана, являющегося доступным и сравнительно дешевым сырьем, открывает перспективы производства биопротеина и ряда других продуктов с добавленной стоимостью. Промышленное производство кормового белка (Гаприна) из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 было реализовано в СССР в середине 1980-х. В настоящее время эта технология переживает этап трансформации в технологию второго поколения, в том числе за счет поиска новых штаммов-продуцентов, что являлось целью этой работы. Для поиска новых штаммов метанотрофов использовали образцы, отобранные из природных и техногенных местообитаний с высокой доступностью метана — активный ил очистных сооружений, осадки пресноводных водоемов и покрывающую почву полигона твердых бытовых отходов. Работы по культивированию позволили получить 4 изолята термотолерантных метанотрофов, обнаруживающих 98,56–

99,35 % сходства последовательностей гена 16S рНК с таковой у *Mс. capsulatus* Bath. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений позволила получить замкнутые геномы размером от 3,2 до 4 млн п. о. Пангеномный анализ показал, что многообразие генов во всех доступных геномах *Methylococcus* представлено 4485 кластерами, 52 % которых присутствуют в геномах всех штаммов, что говорит о высокой консервативности геномов представителей рода *Methylococcus*. Культивирование новых изолятов в проточном режиме в модельных биореакторах показало, что ростовые параметры новых штаммов сравнимы или превышают таковые у *Mс. capsulatus* Bath. Высокие показатели роста и отсутствие в геномах полных последовательностей профагов указывают на перспективность новых изолятов рода *Methylococcus* для производства биопротеина из природного газа и позволяют использовать их в качестве объектов дальнейших работ по метаболической инженерии.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

НОВАЯ МОДЕЛЬ НЕ ПРИКРЕПЛЕННЫХ К ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АГРЕГАТОВ, ОСНОВАННАЯ НА ЯВЛЕНИИ МАГНИТНОЙ ЛЕВИТАЦИИ

Домнин П. А.^{1,2*}, Архипова А. Ю.², Петров С. В.³, Сысолятина Е. В.¹, Каралкин П. А.³, Мухачев А. Я.¹, Гусаров А. И.¹, Мойсенович А. М.², Лобакова Е. С.², Хесуани Ю. Д.³, Ермолаева С. А.¹

¹НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

²МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

³3D Bioprinting Solutions Ltd., Москва

*paveldomnin6@gmail.com

Введение

Возбудители хронических бактериальных инфекций, вероятно, существуют в организме не в виде прикрепленных к поверхностям биопленок, а в виде свободно плавающих бактериальных агрегатов (Alhede et al., 2011). Необходимы *in vitro* модели для выращивания подобных агрегатов и изучения их свойств.

Цель

Изучить возможность формирования неприкрепленных бактериальных агрегатов в условиях магнитной левитации.

Материалы и методы

Для создания эффекта магнитной левитации (состояния, при котором сила гравитации уравновешивается магнитной силой) была использована специальная установка – магнитный биопринтер, разработанная в «3D Bioprinting Solutions Ltd». В исследовании использовались штаммы *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Свойства полученных бактериальных агрегатов были изучены с помощью КЛСМ, СЭМ, высевов из агрегатов и окружающей их питательной среды и оценки связывания агрегатами красителя конго красного. Биопленкообразование изучалось с помощью стандартного метода на 96-луночном планшете.

Результаты

Все использованные в исследовании штаммы бактерий в условиях магнитной левитации образовали видимые невооруженным глазом макроагрегаты, состоящие из микроагрегатов. На снимках, полученных методами КЛСМ и СЭМ, видно, что микроагрегаты образованы бактериальными клетками, погруженными во внеклеточный матрикс. Имеются различия между штаммами по эффективности образования неприкрепленных агрегатов. Эффективности формирования неприкрепленных агрегатов и биопленок не коррелировали при сравнении разных штаммов.

Закключение

В ходе исследования было установлено, что бактерии в условиях магнитной левитации формируют неприкрепленные агрегаты, состоящие из бактерий и внеклеточного матрикса, тем самым напоминая структуру биопленки. Способность формировать неприкрепленные агрегаты не коррелирует со способностью формировать биопленки.

КОНКУРЕНТНЫЙ БИОСИНТЕЗ АЛЬГИНАТА И ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА БАКТЕРИАЛЬНЫМ ШТАММОМ *AZOTOBACTER VINELANDII* 12 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Дудун А. А.¹, Акулина Л. А.², Жуйков В. А.¹, Махина Т. К.¹, Воинова В. В.²,
Бонарцев А. П.^{1,2}, Бонарцева Г. А.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

²Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В последнее время использование бактериальных альгинатов и полиоксиполуакрилатов (ПОА) привлекает все большее внимание исследователей, работающих в тканевой инженерии [1]. Альгинаты, как и ПОА являются биополимерами с свойствами к биосовместимости, которые также характеризуются способности к биодegradации, т. е. способности материала распадаться и выводиться из организма в процессе естественных химических реакций [2]. Все это дает большую перспективу для использования этих полимеров в медицине. Альгинат является гидрофильным неразветленным экзополисахаридом, имеющим в наличии 2 уроновые кислоты в качестве мономеров: (1–4)-β-D-Маннуроновая кислота (М) и её C5-эпимер α-L-Гулууроновая кислота (G) [3] и ПОА — это полукристаллический гидрофобный полиэфир масляной кислоты, у которого кристаллическая фаза доминирует над аморфной [4]. К одновременному синтезу альгинатов и ПОА способны некоторые виды бактерий рода *Azotobacter sp.* Эти микроорганизмы являются продуцентами поли-3-оксибутирата (ПОБ), способные синтезировать его до 80 % от сухого веса клеток бактерий и накапливать его внутри в виде гранул [5]. Также во внешнюю среду эти бактерии синтезируют альгинат, который является протектором против избыточной концентрации молекулярного кислорода в среде.

Особенностью бактерий *Azotobacter sp.* лежит не только в одновременном синтезе 2 биополимеров, но и в возможности регулирования процесса синтеза полимеров и тем самым получении их в широком спектре физико-химических свойств. Данного преимущества лишены бурые водоросли, которые и по сей день служат основным источником получения альгината в промышленности.

В данной работе был проведен полный факторный эксперимент (ПФЭ) по культивированию бактериального штамма *Azotobacter vinelandii* 12 с целью синтеза альгинатов и ПОБ, и оценки этих биополимеров на физико-химические свойства. Для этого в процессе культивирования штамма *A. vinelandii* 12 на жидкой среде Берка были выбраны три фактора (2³), а именно: концентрация сахарозы, концентрация фосфатов и концентрация растворенного молекулярного кислорода в ростовой среде. Все факторы варьировались по двум уровням: низкие концентрации (-) и высокие концентрации (+) (Таблица 1).

Таблица 1

Полный факторный эксперимент 2³ (ПФЭ) культивирования *A. vinelandii* 12

	C-/P-/O-	C+/P-/O-	C-/P+/O-	C+/P+/O-	C-/P-/O+	C+/P-/O+	C-/P+/O+	C+/P+/O+
Сахароза г/л; (C) (+)-35; (-)-15.	-	+	-	+	-	+	-	+
Фосфаты г/л; (P) (+)-1.25; (-)-0.05.	-	-	+	+	-	-	+	+
Кислород грм; (O) (+)-210; (-)-150.	-	-	-	-	+	+	+	+

По окончании ферментации после 72 часов, все варианты ПФЭ 2³ были центрифугированы при 11000 g в течение 30 минут с целью разделения клеточной биомассы и культураль-

ной жидкости для выделения двух разных типов альгината, а именно свободный, который выделяется непосредственно из культуральной среды и капсулярный, который выделяется из клеточной биомассы. Свободный альгинат был выделен методом спиртового осаждения при 4400 g в течение 15 минут. После полученный осадок был лиофилизирован в течение суток. Капсулярный альгинат выделяли с помощью добавления к клеточной массе 1M раствора NaCl и 100 mM EDTA в соотношении 1:8:1 (биомасса: NaCl: EDTA). Далее смесь инкубировали 1 час при 60 °C с перемешиванием на орбитальном шейкере до полной гомогенизации раствора. После супернатант получали путем центрифугирования и затем осаждали 3 объемами охлажденного 80% этилового спирта. По окончании осаждения полученный осадок лиофилизировали [6].

Выделение ПОБ из клеточной биомассы осуществляли экстракцией хлороформом в течение 12 ч при 37 °C. Полученный экстракт отделяли от клеточных остатков фильтрацией и затем ПОБ выделяли из хлороформного экстракта осаждением изопропиловым спиртом. Стадию растворения в хлороформе и осаждения ПОБ изопропиловым спиртом повторяли не менее 3 раз. ПОБ сушили при 60 °C.

Все полученные полимеры были исследованы на физико-химические свойства, а именно на определение молекулярных масс (ММ) методом вискозиметрии, определение химических структур альгинатов и ПОБ методами ИК-спектроскопии и ¹H-ЯМР анализа, а также на определение их механических свойств, такие как водопоглощение и вязкоупругость.

Результаты общего выхода полимеров показали, что за счет ограничения главного источника углерода, а именно сахарозы, и достижения высокой концентрации фосфатов и высокого уровня аэрации; возможно достигать изолированного синтеза капсулярного альгината (рис. 1).

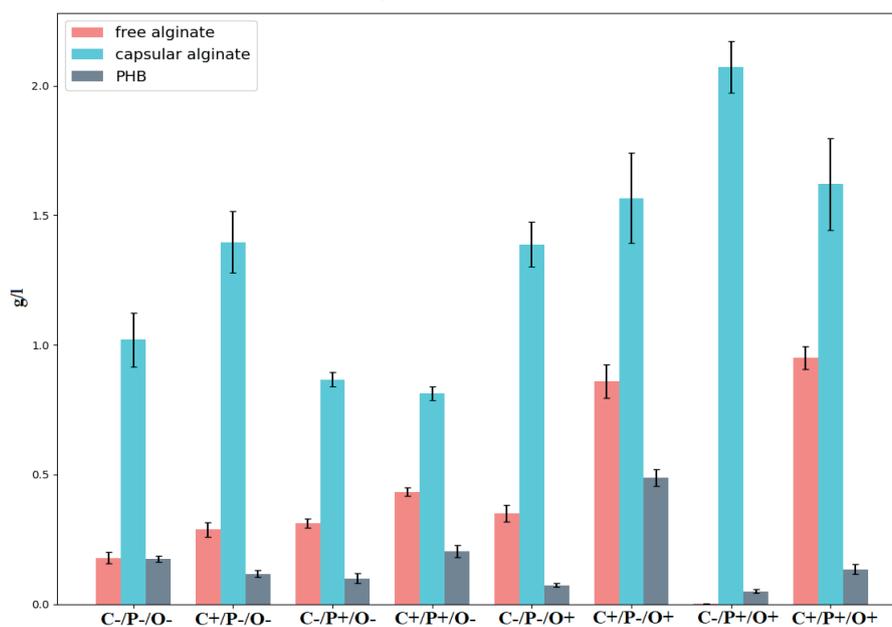


Рисунок 1. Общий выход полимеров в ПФЭ 2³

Этот факт представляет большой биотехнологический интерес, поскольку здесь мы наблюдаем тот редкий случай, когда можно получить только высокомолекулярный капсулярный альгинат без примеси низкомолекулярного свободного альгината.

Результаты физико-химических исследований показали большие различия по молекулярным массам (ММ) между свободными и капсулярными альгинатами: свободные альгинаты во всех опытах имели массу в районе 100-110 kDa, в тоже время капсулярный значительно различался между разными опытами в ПФЭ и также имел более высокую ММ сравнительно с свободным альгинатом.

По данным ИК-спектров бактериальных альгинатов во всех опытах мы можем определить мономерный состав M/G полимера и уровень ацетилирования. Распределение урону-

вых кислот свободных и капсулярных альгинатов показало, что во всех образцах преобладают маннуроновые блоки в цепи. Уровень ацетилирования определяли по соотношению полос 1600 см⁻¹ к 1720 см⁻¹. Количество ацетильных групп на маннуроновых остатках свободных альгинатов во всех вариантах опытов различается незначительно (23-32 %) и выше в сравнении с капсулярными (6-27%). Важно отметить, что вариант С-/Р+/О+, в котором мы наблюдаем синтез только капсулярного альгината, имеет высокое ацетилирование (25%), поэтому мы можем предполагать, что в этих условиях *A. vinelandii* 12 может синтезировать без ПОб и свободного альгината, альгинат высокой молекулярной массы и с высоким уровнем ацетилирования, что может быть полезно для многих биотехнологических и биомедицинских задач.

Для изучения реологических свойств капсулярных альгинатов по результатам ММ были отобраны альгинаты С+/Р-/О- с наименьшей ММ (212 кДа) и альгинат С+/Р+/О- с наибольшей ММ (574 кДа). В качестве контроля был выбран коммерческий альгинат водорослей со средней ММ 120-180 кДа. На основании результатов динамической вязкоупругости было обнаружено, что капсулярный альгинат с высокой молекулярной массой (574 кДа) демонстрирует гидрогели наивысшей плотности.

Результаты теста по водопоглощению показали, что из-за более высокой молекулярной массы альгинат кальция массой 574 кДа создает больше точек сшивания гулуранов с ионами кальция в первичной альгинатной цепи, тем самым создавая более обширную полимерную сеть для проникновения молекул воды. Водопоглощение бактериального ПОб имел всего 1,2 %, причина такого низкого водопоглощения в гидрофобной природе полимера.

Данные результаты демонстрируют, что за счет регулирования условий культивирования (сахароза, фосфаты и кислород) можно бактериальным синтезом получать альгинаты и ПОб с различными физико-химическими характеристиками. Таким образом, мы можем синтезировать биополимер с заранее заданными свойствами, подходящие для определенных биотехнологических и биомедицинских задач.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СРЕДЫ ОБИТАНИЯ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ

Дымова А. А., Шеф К. А., Дешевая Е. А., Харин С. А., Гуридов А. А., Поддубко С. В.

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

1. Введение

По мере возрастания продолжительности работы экипажа на борту орбитальных комплексов и общих сроков их непрерывной эксплуатации существенно возрастает значение эколого-гигиенических проблем обитаемости космических объектов, среди которых важнейшее место занимает микробиологический фактор. Рассматривая взаимоотношения мира микроорганизмов с факторами техногенного воздействия, наряду с исключительной способностью бактерий и грибов к фенотипической адаптации (приспособлению к измененным условиям среды), следует учитывать также их подверженность генотипическим изменениям. Принимая во внимание повсеместную распространенность микроорганизмов в окружающей среде, следует ожидать присутствия самых разнообразных видов бактерий и грибов в кабинах пилотируемых космических объектов.

2. Материалы и методы

В течение многолетней непрерывной эксплуатации МКС регулярно проводится микробиологический контроль состояния воздушной среды и поверхностей интерьера и оборудования обитаемых отсеков. Изучение аэрозольной фазы обитаемых отсеков РС МКС проводится в рамках бортовой штатной методики «Контроль микроэкоферы среды обитания» (МО-21), аспирационно-седиментационным методом. Отбор микрофлоры воздуха проводится обычно не реже чем 1 раз в 3 месяца.

Для санитарно-микробиологической оценки поверхностей РС МКС на борту станции проводится отбор проб с интерьера и оборудования в рамках бортовой штатной методики «Контроль санитарно-эпидемиологического состояния» (МО-22). Отбор проб проводится методом смыва с поверхности площадью 10 10 см. Доставка использованных «Укладок с

пробирками» с уже отобранными пробами на Землю для проведения лабораторных исследований осуществляется при возвращении сменяемого экипажа.

3. Результаты и обсуждение

В процессе многолетней эксплуатации Международной космической станции регулярно проводились исследования количественного содержания и видового состава микроорганизмов, формирующихся в обитаемых отсеках. Всего в среде обитания орбитального комплекса в процессе работы более 60 основных экспедиций было обнаружено около 80 видов микроорганизмов, из них 45 видов бактерий и 35 видов грибов.

За период 60 выбранных экспедиций были отобраны 980 пробы воздуха. В 756 пробах были обнаружены бактерии. За этот же период были отобраны 1264 пробы с поверхностей интерьера и оборудования. Из них в 952 пробах были обнаружены бактерии. В 353 пробах отмечено содержание бактерий до 10×10^4 колониеобразующих единиц (КОЕ) на 100 см^2 , в 15 пробах – до $1,0 \times 10^5$ КОЕ и в 16 пробах – до $1,0 \times 10^6$ КОЕ.

4. Заключение

В результате бортовых экспериментов, выполненных на Международной космической станции в период работы 60 основных экспедиций, из среды обитания было выделено и идентифицировано 80 видов микроорганизмов, среди которых присутствовали как условно патогенные бактерии и грибы, так и организмы-технофилы, способные вызывать биоповреждения полимерных материалов и биокоррозию металлов.

УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗА ОРТОПОКСВИРУСОВ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Дятлова Е. А.*, Жарков Д. О.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

* jannie.lapt@gmail.com

Вирусный ДНК-геном, наравне с геномом клеточных организмов, подвергается воздействию повреждающих агентов, при этом образуется широкий спектр повреждений ДНК. В основном вирусы используют для репарации своего генома ферменты клетки-хозяина, однако некоторые вирусы с большим ДНК-геномом кодируют собственные ферменты репарации. Например, мимивирусы, ВИЧ, герпесвирусы и поксвирусы кодируют урацил-ДНК-*N*-гликозилазу (UNG) – фермент, который распознает и удаляет урацил из ДНК. Помимо функции удаления урацила, UNG поксвирусов (D4) принимает участие в репликативном комплексе вирусной полимеразы, формируя ее фактор процессивности. Т. к. для ДНК-гликозилаз показано, что в процессе поиска мишеней они способны с высокой эффективностью осуществлять одномерную диффузию вдоль цепи ДНК, в основе работы D4 как фактора процессивности может лежать собственная процессивность фермента. Известно, что поксвирусы, нокаутные по гену D4, не способны к репликации, что делает UNG хорошей мишенью для противовирусной терапии. В данной работе была исследована процессивность UNG вируса осповакцины, а также проведен скрининг ингибиторов UNG.

Для оценки эффективности поиска мишеней UNG путем одномерной диффузии вдоль ДНК использовали метод коррелированного расщепления олигонуклеотидного субстрата, содержащего два повреждения, разработанный в ЛГБИ ИХБФМ СО РАН. По соотношению начальной скорости накопления продукта коррелированного расщепления к суммарной скорости расщепления, рассчитывалась величина P_{cc} . В распоряжении лаборатории находилась библиотека ингибиторов семейства урацил-ДНК-гликозилаз, предсказанная методом молекулярного докинга.

Эффективность коррелированного расщепления P_{cc} фермента UNG вируса осповакцины при низких концентрациях ионов была высокой ($P_{cc} = 0,73$) по сравнению со значениями для урацил-ДНК-гликозилаз *E. coli* и человека. Наличие одноцепочечного разрыва или брешы между повреждениями не влияло на P_{cc} , а также при увеличении расстояния между повреждениями P_{cc} снижалась значительно медленнее, чем для его гомологов. Полученные резуль-

таты говорят о высокой процессивности вирусного UNG. Среди потенциальных ингибиторов UNG были найдены два соединения, которые в микромолярных количествах подавляли активность UNG, один из них также снижал его процессивность.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-14-01190П.

ГЕНОМИКА ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТКОВ

Ельченинов А. Г.^{1,*}, Угольников Я. А.², Тошаков С. В.³, Сорокин Д. Ю.¹, Кубланов И. В.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

²МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

³НИЦ «Курчатовский институт», Москва

*elcheninov.ag@gmail.com

Целлюлоза является одним из самых распространенных на Земле биополимеров. Несмотря на то, что целлюлоза является довольно ригидным полимером, существует достаточно много микроорганизмов, способных ее гидролизовать, среди которых широко представлены бактерии и некоторые эукариоты. При этом до недавнего времени почти ничего не было известно о представителях домена *Archaea*, в частности галофильных археях, способных использовать целлюлозу в качестве единственного источника углерода и энергии. Недавно нами было опубликовано несколько работ, описывающих новых представителей *Halobacteria*, растущих на целлюлозе. Тем не менее, данное свойство галоархей остается подтвержденным пока лишь микробиологическими и отчасти биохимическими методами.

Целями данной работы являются оценка способности всех известных галоархей расти на целлюлозе и *in silico* реконструкция путей разложения целлюлозы у галофильных архей методами сравнительной геномики.

Нами были секвенированы геномы 7 штаммов культивируемых галоархей-целлюлозолитиков из групп AArce1 (растущие при значении pH от 9,5) и HArce1 (растущие при нейтральном pH), принадлежащих к порядкам *Natrialbales* (AArce1, AArce2, AArce5, AArce7) и *Halobacteriales* (HArce1, HArce2, HArce3). В данных геномах, а также в 146 высококачественных геномах культивируемых представителей *Halobacteria* были обнаружены гены CAZymes и проанализирована их принадлежность к известным семействам CAZymes. Основываясь на сигнатурных наборах гликозидаз, было предложено выделение 13 геномов (включая все семь штаммов AArce1/HArce1) в группу целлюлозолитиков. Для штаммов групп AArce1/HArce1 нами были реконструированы пути гидролиза целлюлозы и катаболизма ее мономера – глюкозы. Центральный метаболизм сахаров был представлен гликолизом и полуфосфорилирующим КДФГ-путем. Также в геномах этих штаммов были выявлены гены, кодирующие портеры (суперсемейство 2.A) и ABC-транспортеры (суперсемейство 3.A), гомологичные транспортерам углеводов.

В данной работе мы определили распространенность ферментов, определяющих полисахаридолитический потенциал *Halobacteria*, выделив в группу целлюлозолитиков 13 представителей (включая штаммы AArce1/HArce1), для которых были реконструированы пути метаболизма целлюлозы.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 20-14-00250.

ХАРАКТЕРИСТИКА GO-СИСТЕМЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МИШЕНИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

Ендуткин А. В.^{1,*}, Жарков Д. О.²

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, aend@niboch.nsc.ru

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, dzharkov@niboch.nsc.ru

* aend@niboch.nsc.ru

Введение: Устойчивость патогенов к антибиотикам — одна из самых острых проблем современного здравоохранения. Для ее преодоления и предотвращения часто используется комбинированная терапия, в которой сочетаются средства разных классов действия. Системы антиоксидантной защиты и репарации окислительных повреждений у бактерий рассматриваются как многообещающие мишени для повышения чувствительности к антибиотикам. В рамках работы предполагалось оценить функции GO-системы, ответственной за репарацию окислительных повреждений ДНК, из микроорганизма *Staphylococcus aureus*, и ее перспективность в качестве мишени для комбинированной антибиотикотерапии.

Материалы и методы: кДНК соответствующих белков SauFpg1, SauFpg2 и SauMutY, входящих в предполагаемую GO-систему *S. aureus*, с оптимизированными кодонами для экспрессии в *E. coli* были получены путем тотального генного синтеза, клонированы в вектор pET-22b и выделены после наработки в штамме *E. coli* Rosetta 2 (DE3). Субстратная специфичность белков исследована в условиях стационарной кинетики и с помощью метода борогидридной сшивки. Производные штамма *E. coli* CC104, дефицитные по генам GO-системы, были трансформированы экспрессионными плазмидами, несущими вставки ДНК-гликозилаз GO-системы *S. aureus* и исследованы на возможность фенотипической комплементации.

Результаты и обсуждение: Показано, что белки SauFpg1 и SauFpg2 преимущественно удаляют из ДНК остатки 8-оксогуанина (охоG) и несколько менее эффективно — окисленные пиримидины. Как SauFpg1, так и SauFpg2 преимущественно расщепляют ДНК, содержащую повреждения напротив C, и с наименьшей эффективностью — в случае повреждений напротив A. Фермент SauMutY одинаково эффективно удалял A из пар с G и охоG. Это хорошо согласуется с функционированием аналогичных ферментов в охарактеризованных GO-системах других бактерий. Нокаут гена *fpg* *E. coli* сопровождался повышением чувствительности бактерий к β -лактамам антибиотикам цефалоспоринового ряда — цефтриаксону и цефотаксиму, а гетерологичная экспрессия генов *fpg1* и *fpg2* *S. aureus* снижала чувствительность в нокаутных штаммах. Чувствительность возрастала еще больше при дополнительном окислительном стрессе, вызванном перекисью водорода.

Выводы: В совокупности полученные результаты свидетельствуют о перспективности фармакологического подавления активности фермента Fpg для сенсбилизации бактерий к действию цефалоспоринов.

ПОЛОЖИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ МУТАНТНОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ (суА^{K432Q}) НА РОСТ *E. COLI* НА ЭТАНОЛЕ

Еремина Н. С.*, Стойнова Н. В., Ямпольская Т. А.

Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика», Москва

*Natalya_Eremina@agri.ru

В настоящее время этанол является одним из перспективных видов промышленного сырья, однако широко используемый в биотехнологии микроорганизм *E. coli* не способен его утилизировать. Ранее был сконструирован способный расти на этаноле штамм MG1655 P_{ltac}-adhE*-m2 с усиленной экспрессией устойчивой к кислороду мутантной алкогольдегидрогеназы (AdhE, EC:1.1.1.1.), (1). На его основе методом адаптивной эволюции был получен штамм FEt, демонстрирующий увеличенную в 1,4 раза скорость роста на этаноле (2). Данная работа посвящена анализу генетических механизмов, обеспечивающих указанный фенотип штамма FEt.

В штамме FEt методом Nimble Gen CGS («comparative genomic sequencing») было обнаружено 8 генов, содержащих значимые мутации. Наиболее существенной оказалась суА^{K432Q} в гене, кодирующем аденилатциклазу; фермент синтезирует в клетке сАМР, являющийся кофактором транскрипционного регулятора катаболитной репрессии CRP.

Полная инактивация суА в штамме MG1655 P_{ltac}-adhE*-m2 приводит к утрате способности расти на этаноле; в то же время, введение суА^{K432Q} ускоряет рост на этаноле в 1,3 раза, но не влияет на скорость роста на глюкозе. Мутация суА^{K432Q} активирует скорость роста клеток

на источниках углерода, метаболизирующихся с образованием ацетил-КоА (этанол, ацетат). В то же время, она отрицательно влияет на скорость роста на источниках углерода, утилизируемых ферментами, экспрессия которых контролируется механизмом катаболитной репрессии (сукцинат, глицерин, ксилоза). Однако, неметаболизируемые аналоги глюкозы подавляют рост на этаноле как штамма, содержащего *суаA^{WT}*, так и штамма, несущего *суаA^{K432Q}*.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что мутация *суаA^{K432Q}*, по-видимому, снижает активность аденилатциклазы. Эта мутация, очевидно, изменяет внутриклеточный пул сАМР и, как следствие, обладает плейотропным эффектом. Подобные мутации могут быть полезны для расширения круга источников углерода, используемых в биотехнологии.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ОТКЛИК ДРЕВНИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ НА ВОЗМОЖНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОТЕПЛЕНИЯ

Еромасова Н.^{1*}, Журавлёва А.¹, Суханов А.^{1,2}, Спирина Е.¹, Ривкина Е.¹

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино

²МГУ, факультет биотехнологии, Москва

*eromasova.n.i@gmail.com

Введение. Интерес к изучению микроорганизмов вечной мерзлоты во многом связан с повышением температуры отложений, зафиксированной в результате многолетних наблюдений. На сегодняшний день знания о метаболическом потенциале микробных палеосообществ, их адаптивных стратегиях и механизмах сохранения жизнеспособности в многолетнемёрзлых отложениях крайне ограничены. Цель – получить данные об активности внутри- и внеклеточных ферментов, изменении структуры и состава микробных сообществ вечной мерзлоты различного возраста и генезиса в результате экспериментов, моделирующих процесс оттаивания.

Материалы и методы. В работе использовали образцы вечной мерзлоты (Колымская низменность) различного возраста и генезиса: эпикриогенные (морские – скв. 14/99, 100–150 тыс. лет; озёрно-аллювиальные – скв. 2/94, 600–1000 тыс. лет; скв. 5/94, 100–10000 тыс. лет) и синкриогенные (ледовый комплекс (Едома) – скв. 1/19, ~30 тыс. лет) отложения. Работу проводили на мёрзлых и предынкубированных при 15 °С пробах. Метагеномную ДНК выделяли с помощью DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Германия). Генетическое разнообразие бактерий оценивали методом ДНК-метабаркодинга. Для выявления внутри- и внеклеточной ферментативной активности древних микробных сообществ использовали метод MicroResp™ (утилизация углеродсодержащих субстратов) и EEA Assay (определение интенсивности синтеза гидролитических ферментов в ответ на внесение флюорогенно-меченых субстратов) соответственно.

Результаты и обсуждения. Для всех образцов, независимо от возраста и генезиса, показано, что бактерии филумов *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria* являются доминантами. Анализ ферментативной активности предынкубированных проб выявил значительный отклик внутриклеточных ферментов на внесение карбоновых (66–88 %) и аминокислот (7–15 %), а внеклеточных – лейцинаминопептидазы (35–56 %), сульфатазы (19–28 %) и фосфатазы (13–26 %).

Мы полагаем, что столь незначительные различия ферментативных профилей микробных сообществ вечной мерзлоты разного возраста и генезиса, могут отражать не реакцию микроорганизмов на внесенные субстраты, а свидетельствовать скорее о потребности в них для репарации клеточных структур, поврежденных в результате длительной естественной криоконсервации.

Работа выполнена в рамках госзадания ИФХиБПП РАН АААА-А18-118013190181-6 и при поддержке и гранта РФФИ №19-04-01240.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ФИТОСФЕРОЙ ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО (*THYMUS VULGARIS* L.)

Жаркова Е. К.^{1*}, Ванькова А. А.¹, Дренова Н. В.²

¹Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева

²ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

*ekzharkova.tsha@yandex.ru

Микроорганизмы являются неотъемлемой частью агроценоза. Микробные сообщества фитосферы играют важную роль в процессах роста и развития культурных растений, поддержании их естественного иммунитета, обеспечении устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. С другой стороны, растение является мощным средообразующим фактором, определяющим формирование и контроль своего микробиома. Изучение растительно-микробных систем представляет собой фундаментальную основу для разработки биотехнологий повышения урожайности сельскохозяйственных культур и качества продукции.

Объектом исследования служили микробные сообщества, ассоциированные с ценным фармакопейным лекарственным растением – тимьяном обыкновенным (*Thymus vulgaris* L.) – представителем флоры Средиземноморья, интродуцируемым в настоящее время в зоне дерново-подзолистых почв. Образцы отбирали на делянках коллекционного участка Овощной опытной станции им. В. И. Эдельштейна РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (г. Москва). Микробные сообщества фитосферы изучали с помощью методов питательных пластин на глюкозо-пептоном агаре, геноиндикации (ПЦР-РВ) и метагеномного анализа.

Количество культивируемых микроорганизмов в фитосфере тимьяна обыкновенного (*T. vulgaris* L.), различалось в зависимости от фенологической фазы растения. Наибольшее количество бактерий обнаруживалось в ризоплане в фенофазу массового цветения ($18,2 \times 10^5$ КОЕ/г сух. биомассы), наименьшее – в филлосфере в период отрастания ($3,3 \times 10^5$ КОЕ/г сух. биомассы). Грибы обильно развивались в ризосфере преимущественно во время отрастания и вторичного цветения. Наибольшее количество копий генов бактерий, архей и грибов выявлено в ризосфере, при удалении от корней растений эта величина снижается. Установлены различия в структуре бактериальных сообществ ризосферы и контрольной почвы, свободной от растений. Из ризосферы тимьяна выделены штаммы бактерий, обладающие способностью к азотфиксации, синтезу росторегулирующих и антимикробных веществ, разложению ароматических соединений. Полученные штаммы перспективны для агробиотехнологии и представляют интерес для дальнейших исследований, направленных на повышение адаптационных возможностей тимьяна обыкновенного к условиям зоны дерново-подзолистых почв.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛОВ

Жгун А. А.^{1*}, Думина М. В.¹, Покровская М. В.², Александрова С. С.², Жданов Д. Д.²,
Соколов Н. Н.², Эльдаров М. А.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К. Г. Скрыбина, Москва, office@biengi.ac.ru

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, inst@ibmc.msk.ru

*ZZhgun@mail.ru

L-аспарагиназа (L-АСП) – важный для биотехнологии фермент, применяемый в онкогематологии, при создании биосенсоров, а также в технологиях пищевых производств. Основными недостатками применяемых на данный момент L-АСП являются низкая субстратная специфичность и недостаточная стабильность. Среди новых источников активных, высокостабильных L-АСП особый интерес представляют экстремофилы. Для сравнительной характеристики в работе были выбраны микроорганизмы 3 классов, устойчивые к различным

экстремальным условиям обитания: термоацидофильная архея *Acidilobus saccharovorans*, термофильная бактерия *Melioribacter roseus* и психрофильный гриб *Sclerotinia borealis*.

Цель работы – получение рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, экспрессирующих L-АСП экстремофилов *S. borealis* (SbA), *A. saccharovorans* (AsA), *M. roseus* (MrA), сравнительное исследование специфической активности рекомбинантных L-АСП.

Материалы и методы: для поиска и анализа последовательностей применяли методы биоинформатического анализа. При создании рекомбинантных штаммов использовали стандартные генно-инженерные подходы. Влияние на ферментативную активность L-АСП температуры, pH, ионов металлов оценивали по методу прямой несслеризации на препаратах неочищенных экстрактов.

Результаты и обсуждение: активные формы ферментов в рекомбинантных штаммах *E. coli* получили путем экспрессии нативного гена *mrA*; для *asA* и *sbA* потребовалась оптимизация кодонового состава. При скрининге на неочищенных экстрактах максимальная активность была выявлена для MrA – 9,6 МЕ/мл при 37 °С и pH 9,6. Для AsA значения составили 2,6 МЕ/мл при 94 °С и pH 5,2, SbA – 0,6 МЕ/мл при 24 °С и pH 9,6. Выявлено, что максимальную активность MrA проявлял при 75 °С и pH 9,0. Добавление ионов металлов (1,0 мМ) оказывало различное действие на активность MrA: полное ингибирование выявлено для Cu^{2+} и Zn^{2+} , изменение активности в диапазоне 5÷28 % обнаружено при добавлении Fe^{3+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Заключение: полученные в работе результаты создают предпосылки для дальнейшего изучения свойств и кинетических характеристик очищенных препаратов L-АСП этих экстремофилов. Изученные L-АСП различны по активности, характеру влияния на нее температуры и pH. Проявляющая наибольшую активность MrA видится наиболее перспективным объектом для последующего детального изучения энзиматических характеристик и использования в биотехнологической промышленности.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-08-01112.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МЕТАБОЛИЗМОМ ПОЛИАМИНОВ И ПРОДУКЦИЕЙ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Жгун А. А.^{1,*}, Нураева Г.К.¹, Думина М.В.¹, Авданина Д.А.¹, Карпова Н. В.¹,
Потапов М. П.^{1,2}, Хомутов М. А.³, Январев Д. В.³, Хомутов А. Р.³

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К. Г. Скрябина, Москва, office@biengi.ac.ru

²ПушГЕНИ, Пушкино, uu@pushgu.ru.

³ИМБ РАН, Москва, isinfo@eimb.ru

*ZZhgun@mail.ru

Алифитические полиамины (ПА), такие как путресцин, спермидин, спермин, встречаются у всех микроорганизмов. Существует жесткий контроль содержания ПА в клетке; для этого регулируются как пути их биосинтеза, так и катаболизма. Для ПА известен целый ряд функций, связанных с регуляцией биосинтеза белка, контролем клеточной дифференцировки, стрессоустойчивостью и многие другие. В последние годы появились данные, показывающие влияние ПА на биосинтез вторичных метаболитов (ВМ) у мицелиальных грибов. В связи с этим целью нашей работы явилось установление молекулярных основ взаимосвязи между метаболизмами ПА и биосинтезом ВМ у этих микроорганизмов.

В качестве объектов исследования использовали штаммы мицелиальных грибов, *Acremonium chrysogenum* и *Aspergillus terreus*, дикого типа и полученные на их основе высокоактивные продуценты (ВАП) антибиотика цефалоспорина С и холестерин-понижающего препарата ловастатина, соответственно. У ВАП выход целевых ВМ был повышен в 100 и более раз в результате классических методов (случайный мутагенез и скрининг), однако при этом не было четкого понимания о молекулярных изменениях, приведших к оверпродукции. Одним из наиболее интригующих сопутствующих феноменов, обнаруженных в ходе работы, явилось увеличение выхода целевых ВМ при экзогенном введении ПА в процессе ферментации

ВАП. В работе также охарактеризовали изменения, произошедшие в геномах ВАП, показали, как эти изменения отразились на уровнях экспрессии генов биосинтеза ПА, биосинтетических кластеров и содержания ПА в грибных штаммах. В результате ингибиторного анализа показали увеличение активности ключевого фермента биосинтеза ПА, орнитиндекарбоксилазы (ODC), у ВАП, что коррелирует с повышением содержания ПА в клетке [Hyyönen M.T., et.al. *Biomolecules*. 2020, 10(3), 406; Zhgun A. A. et.al. *Appl Sci*. 2020, 10(22), 8290]. Обнаруженные изменения в метаболизме ПА могут быть следствием программ улучшения ВАП и возникать как сопутствующие мутации, позволяющие выживать грибным клеткам при сублетальных воздействиях мутагенов. При ферментации ВАП добавление экзогенных ПА приводит к ингибированию их эндогенного синтеза, что высвобождает ресурсы для продукции ВМ.

Полученные результаты важны как с фундаментальной точки зрения, так и могут быть масштабированы для нужд биотехнологии, с целью увеличения продукции важных ВМ промышленными штаммами при добавлении относительно дешевых ПА.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-01173.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СТЕРОИДОВ ГРИБАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ

Жгун А. А.^{1,*}, Потапов М. П.^{1,2}, Кардонский Д. А.³, Карпова Н. В.¹, Ядерец В. В.¹,
Стыценко Т. С.¹, Нураева Г. К.¹, Авданина Д. А.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, г. Москва, Проспект
60-летия Октября, 7/1, office@biengi.ac.ru

²ПушГЕНИ, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д. 3, uu@pushgu.ru.

³ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, г. Москва, Малая Пироговская,
д. 1а, info@rcpcm.org

*ZZhgun@mail.ru

При промышленном получении многих биологически активных стероидов используют этапы биотрансформации микроорганизмами, в том числе, мицелиальными грибами. Ранее с экспонатов и залов Государственной Третьяковской галереи (ГТГ) мы изолировали культуры плесневых грибов, способных разрушать органические материалы, используемые в темперной живописи [Zhgun et.al, *PLoS One*. 15 (2020) e0230591]. Поскольку темперные краски создают на основе яичного желтка, содержащего до 2-х % холестерина (в сухом виде), данная группа грибов-деструкторов может представлять интерес для скрининга биотрансформационной активности стероидов. В связи с этим, целью работы стало определение способности трансформировать стероиды грибами-деструкторами темперной живописи.

В качестве субстратов для определения стероид-трансформирующей активности использовали андростендион (АД) и андростендиендион (АДД). Трансформации проводили при нагрузке 1 г/л стероидов как на активно растущей культуре (в питательной среде), так и при ее стационарном росте (в калий-фосфатном буфере). Пробы отбирали через 24, 48, 72 ч после начала трансформации, стероиды экстрагировали этилацетатом и анализировали методами тонкослойной хроматографии и газовой хромато-масс-спектрометрии. Для сопоставления масс-спектров использовали библиотеку NIST 2014 (DOI:10.1007/s13361-016-1589-4) и базу данных Reaxys (<https://www.reaxys.com>). Полученную активность сравнивали с активностью промышленного штамма *C. lunata* ВКПМ-F981.

Для всех изученных штаммов мицелиальных грибов выявили трансформацию стероидов, причем наиболее эффективно, на уровне, близком к контрольному штамму *C. lunata* ВКПМ-F981, трансформацию проводили *Simplicillium lamellicola* STG-96 и *Cladosporium rahalotolerans* STG-93В. Селективную трансформацию показали *Aspergillus versicolor* STG-25G и *A. versicolor* STG-86 (при трансформации АД в тестостерон) и *Microascus paisii* STG-103 (при трансформации АДД в тестолактон). Всего в работе охарактеризовали 33 стероида, образующихся при трансформации АД (для 19-ти из них установили структуру) и 30 стероидов, образовавшихся при трансформации АДД (для 5-ти из них установили структуру).

В нашей работе впервые показано, что грибы-деструкторы темперной живописи способны эффективно трансформировать стероиды и могут использоваться для дальнейшего скрининга эффективных, селективных и, возможно, уникальных реакций биотрансформации стероидов.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОМНЫЕ ПРОФИЛИ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Жгун Е. С*., Кислун Ю. В., Тихонова П. О., Федоров Д. Е., Калачнюк Т. Н., Ильина Е. Н.

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва,
info@rcpcm.org
*ZZhgun@mail.ru

Сегодня воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), являются глобальной проблемой мирового здравоохранения. Они характеризуются хроническим рецидивирующим воспалением слизистой кишечника неизвестной этиологии и приводят к существенному снижению качества жизни и к смерти пациентов. ВЗК ассоциированы с подавлением нормальной кишечной микрофлоры и значительным снижением ее разнообразия и стабильности. В частности, уменьшение бактерий, производителей короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), таких как *F. prausnitzii* и *R. hominis*, в свою очередь, приводит к существенному снижению уровня этих метаболитов.

Среди различных способов коррекции микрофлоры кишечника особое внимание исследователей привлекает трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ), положительный терапевтический эффект которой сопровождается восстановлением нормальной микрофлоры кишечника пациента.

В данном исследовании мы изучили микробиомные и метаболические особенности, характеризующие улучшение здоровья 5 пациентов с ВЗК (2 БК и 3ЯК) после трансплантации фекальной микробиоты.

Метагеномное секвенирование образцов кала, собранных до и в течение 6 месяцев после проведения ТФМ проводили на геномном анализаторе HiSeq2500 (Illumina Inc., США). Газохроматографическое определение КЖК проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ Хроматэк, Россия).

Для обоих видов заболеваний наблюдали обогащение микрофлоры пациентов за счет здоровых видов бактерий (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Faecalibacterium*) и устранения штаммов *E. coli*, а также тенденцию к достижению молярных соотношений КЖК, характерных для здоровых индивидуумов. Наше исследование показало, что обогащение *F. prausnitzii* как результат терапии ТФМ нейтрализует провоспалительное действие патогенных штаммов *E. coli* и может служить косвенным показателем эффективности ТФМ и дополнительным персонализированным фактором для принятия решения об использовании ТФМ у пациентов с ВЗК с целью усиления эффекта терапии.

THE STUDY OF GENOMIC POLYMORPHISM IN CLOSELY RELATED STRAINS OF CYANOBACTERIA *ANABAENA VARIABILIS*

Zhenavchuk O. F.¹, Beletskii A. V.², Mardanov A. V.², Mikheeva L. E.¹

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1-12, Moscow

² Centre "Bioengineering" of RAS, Moscow

Anabaena variabilis ATCC29413, isolated in Mississippi, is fully sequenced model organism for studying of nitrogen fixation, photosynthesis and hydrogen production in heterocyst-forming

cyanobacteria. Mutants derived from this strain are characterized with high level of hydrogen production.

Some independent strains of *Anabaena* isolated from *Azolla* leaf cavities and rice fields are virtually indistinguishable from model strain *A. variabilis* by some molecular and genetic characteristics. Our aim is to deepen the study of genomes of two strains of *Anabaena*, isolated in 1987 in Vietnam: *Anabaena* sp. 182 (rice leaves epiphyte) and *Anabaena* sp. V5 (minor symbiont from *Azolla pinnata*).

PCR fingerprinting with single primer designed on the basis of repeated sequences of IS-elements or tandem repeats in intergenic regions used for molecular genotyping of closely related strains does not detect significant difference among studied strains. Therefore, for the comparative analysis of genomes of *Anabaena* 182, *Anabaena* V5 and the reference strain *A. variabilis* (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/AVA>) we also used the genome-pyrosequencing method (Roche GS FLX). Identified genomic differences with full genome synteny affect no more than 0,63 % of *Anabaena* 182 and 1,2 % of *Anabaena* V5 genomes. Various types of changes are presented:

1. Genome of *Anabaena* V5 contains no incision element (linear chromosome, approx. 37 kb).
2. Single nucleotide substitutions in small number of genes with mainly regulatory function.
3. Intragenic duplications and deletions in genes containing tandem DNA-repeats.

4. Significant part of differences is related to the absence in genomes of *Anabaena* 182 and *Anabaena* V5 number of fix-sized DNA fragments representing multiply copies (98–100 % homology) of three types of IS-elements or genome regions located in different parts of *A. variabilis* chromosomes and two megaplasmids (A and C) which contain integrase genes with surrounding genes. Therefore, genomic differences detected in three independently isolated genetically related strains of *A. variabilis* are due to accumulation of point intragenic mutations in the process of strains divergence (gene polymorphism). Greater role may belong to processes of the reduction of small parts of genome (for *Anabaena* V5) and differences in the rate of mobile elements multiplication, that can be a significant factor in increasing the adaptive capacity of the strain in certain habitat.

GLNR-РЕГУЛОН *LENTILACTOBACILLUS HILGARDII*

Журавлева Д. Э., Исхакова З. И., Каюмов А. Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, darya.ed@gmail.com

Главным регулятором азотного обмена в клетках грамположительных бактерий является фактор транскрипции GlnR семейства факторов транскрипции MerR. Анализ аминокислотной последовательности белка GlnR *Lactobacillus hilgardii* выявил наличие характерного ДНК-связывающего мотива спираль-поворот-спираль, что позволяет предположить наличие ДНК-связывающих свойств. В клетках других бактерий GlnR участвует в регуляции азотного обмена путем связывания с промоторами генов в условиях избытка азотного питания. В бактериях GlnR подавляет экспрессию своего оперона *glnRA*, гена *tnrA* и оперона *ureABC*. Целью работы было определить регулон GlnR *L. hilgardii*.

Поиск промоторов, имеющих в своем составе участок, гомологичный консенсусной последовательности GlnR-боксов в геноме *L. hilgardii* проводили с помощью геномного браузера. Было обнаружено 13 потенциально регулируемых GlnR генов, восемь из которых кодируют белки с известной функцией (*amtB*, *aspA*, *bacF*, *dppE_6*, *glnR*, *mltF_2*, *potD_1*, *serP1_3*), и пять генов – с неизвестной (*00541*, *00542*, *00741*, *00742*, *01073*). Далее возможность взаимодействия GlnR с данными промоторами проверяли *in vitro* с помощью метода задержки в геле. GlnR способен связывать все промоторы предполагаемого GlnR-регулона, но с разной аффинностью. Однако, влияние GlnR на экспрессию этих генов остается неизвестным и требует дальнейших исследований. Также было показано, что PII-подобный белок PotN усиливает ДНК-связывающую активность GlnR в 1,3 раза, а в присутствии 2 мМ АДФ GlnR в 1,6 раза эффективнее связывается с ДНК, чем в присутствии АТФ.

Таким образом, фактор транскрипции GlnR способен связываться с промоторами всех генов предполагаемого оперона, но с разной аффинностью. ДНК-связывающая активность GlnR опосредована взаимодействием с PII-подобным белком PotN в ответ на энергетический статус клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИАНО-МИКРОВОДОРОСЛЕВЫХ СООБЩЕСТВ ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ФОСФОРОМ ЮЖНЫХ И СЕВЕРНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ

Зайцев П. А. , Зайцева А. А., Васильева С. Г., Осипова А. А., Федоренко Т. А.,
Лобакова Е. С., Соловченко А. Е.*

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва
*zaitsev@mail.bio.msu.ru

Сообщества микроорганизмов из местообитаний, загрязненных неорганическим фосфором, являются потенциальным источником штаммов-супераккумуляторов фосфора, способных к его эффективному биоизъятию из муниципальных и промышленных сточных вод.

Образцы воды и почвы были отобраны на двух загрязненных фосфором участках вблизи горно-фосфатных рудников (i) в России (пять образцов далее называются Северными образцами) и (ii) из резервуаров сточных вод в Израиле (два образца далее называются Южными образцами). Образцы исследовались методами светлопольной и флуоресцентной оптической микроскопии. Таксономический состав образцов был изучен методами метагеномики, в том числе 16S *r*PHK метабаркодинга.

Было обнаружено существенное различие между бактериальным биоразнообразием северных и южных участков, хотя их состав оксигенных фототрофных компонентов имеет определенную степень сходства. Образцы из Северной группы показали схожий уровень биоразнообразия (за исключением образца из временного водоёма). Был обнаружен широкий спектр прокариот из филумов Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteria. Из данных образцов также был выделен эукариотический оксигенный фототроф, который был отнесён к роду *Micractinium* из отряда Chlorellales, а также прокариотический оксигенный компонент – трихомные цианобактерии III и IV субсекции.

Более узкое биоразнообразие с большей долей цианобактерий наблюдалось в южных образцах, выделенных как из действующего водоёма, так и из высохшего водоёма. Результаты 16S *r*PHK метабаркодинга показали обилие представителей типов Proteobacteria и Bacteroidetes. Из этих образцов также была выделена доминирующая микроводоросль, отнесенная к роду *Chlorococcum*. На уровне более низких таксонов южные образцы были похожи на северные образцы из временного водоема. Вероятно, ограниченное биоразнообразие отражает также временный тип этих водоемов.

Мы продемонстрировали, что микробные сообщества загрязненных фосфором регионов северных и южных широт резко различаются по своему бактериальному биоразнообразию, но схожи тем, что имеют один доминирующий компонент эукариотического оксигенного фототрофа. Дальнейшее изучение взаимоотношений между микроводорослями, цианобактериями и гетеротрофными бактериями, сосуществующими на эвтрофированных фосфором участках с контрастными климатическими условиями, расширит возможности конструирования устойчивых биовдохновлённых сообществ, способных к эффективному биоизъятию избытка фосфора из сточных вод.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №20-74-10028.

ВЛИЯНИЕ QUORUM SENSING СИСТЕМЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК У *SERRATIA PROTEAMACULANS* 94

Зайцева Ю. В.^{1,*}, Ткаченко Д. Н.¹, Хмель И. А.²

¹Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова,
Ярославль

²Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва
*zjv9@mail.ru

Quorum Sensing (QS) системы регуляции экспрессии генов участвуют в коммуникации бактерий и обеспечивают скоординированный ответ популяций бактерий на внешние факторы. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы различной химической природы, диффундирующие из клеток в культуральную среду и обратно, и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы. QS системы играют важную роль в контроле большого количества клеточных процессов, в частности, в регуляции формирования биопленок. Наиболее исследованы QS системы LuxI/LuxR-типа грамотрицательных бактерий, использующие в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). В предыдущих работах мы показали, что штамм *S. proteamaculans* 94 синтезирует два основных типа сигнальных молекул АГЛ (N-3-оксо-гексаноил-L-гомосеринлактон и N-3-гидрокси-гексаноил-L-гомосеринлактон). Гены *sprI* и *sprR* этой QS системы, кодирующие соответственно синтазу АГЛ SprI и рецепторный регуляторный белок SprR, были клонированы и секвенированы, получены нокаутированные мутанты по этим генам.

Целью данной работы являлась оценка влияния инактивации генов *sprI* и *sprR* на образование биопленок *S. proteamaculans* 94.

Штамм *S. proteamaculans* 94 был выделен из испорченного в холодильнике мяса и идентифицирован путем анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рНК (инвентарный номер EU327084.1). Для измерения образования биопленок культуры бактерий выращивали в полистироловых планшетах (24 часа, 30°C, 150 об/мин). Образование биопленок измеряли после удаления среды, промывки ячеек водой и окрашивания прикрепленных клеток красителем кристаллическим фиолетовым. Краситель из биопленок экстрагировали 96%-ным этанолом, оптическую плотность раствора измеряли при 595 нм с использованием Microplate Reader 2550 (Bio-Rad, США). По интенсивности окрашивания раствора судили об уровне образования биопленок.

При исследовании влияния QS системы на регуляцию образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 было показано, что мутация в гене *sprR* не оказывала влияния на уровень образования биопленок. Напротив, в мутантном штамме по гену *sprI* образование биопленок снижалось вдвое по сравнению с уровнем биопленок в исходном штамме. Ранее нами было показано, что мутация в гене *sprR* не влияла на синтез АГЛ, а в мутантном штамме по гену *sprI* синтез АГЛ отсутствовал. Добавление экзогенного 3-оксо-С6-ГЛ, одного из двух доминантных АГЛ, синтезируемых штаммом *S. proteamaculans* 94 дикого типа, восстанавливало способность мутанта к формированию биопленки практически до уровня исходного штамма. Добавление других видов АГЛ, синтезируемых клетками *S. proteamaculans* 94 в значительно меньшем количестве (С4-ГЛ, С6-ГЛ), не давало подобного эффекта.

Полученные результаты показывают зависимость образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 от синтеза АГЛ; существенную роль в контроле формирования биопленок играет 3-оксо-С6-ГЛ.

Зайцева Юлия Владимировна, zjv9@mail.ru, тел. 89807035301.

РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ И ЕГО ПРИТОКОВ

Захаренко А. С.* , Иванов В. Г., Земская Т. И.
Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
*zakharenko@lin.irk.ru

Метан – неотъемлемый компонент глобального цикла углерода и один из наиболее важных факторов, влияющих на изменение климата. Учитывая современные климатические изменения и большие запасы метана в виде газовых гидратов в осадках оз. Байкал, изучение метанотрофных бактерий, основной функциональной группы, участвующей в окислении CH_4 в аэробных условиях, весьма актуально.

С помощью молекулярных методов (высокопроизводительное секвенирование на платформах Illumina MiSeq и Illumina HiSeq) оценен таксономический состав метанотрофных бактерий в водной толще районов с различными экологическими условиями (фоновые и районы разгрузки газообразных и жидких углеводородов, а также притоки озера Байкал).

Метанооксиляющие бактерии выявлены во всех исследуемых районах. Максимальный вклад (до 65 %) метанооксиляющих бактерий I типа в сообщества отмечен в придонных слоях водной толщи районов разгрузки углеводородов. Почти все последовательности принадлежали неклассифицированным представителям семейства *Methylomonadaceae*, вместе с тем были выявлены единичные последовательности, относящиеся к родам *Methylobacter* и *Crenothrix*. Процент метанооксиляющих *Verrucomicrobia* достигал 3,5 % и был максимальным в районе подводного источника в бухте Фролиха. В пелагических образцах метанотрофы II типа не были выявлены.

В речных сообществах вклад метанооксиляющих бактерий был гораздо ниже (до 3,5 %), при более высоком разнообразии. Среди них доминировали *Methylacidiphilaceae* (до 3,2 %). Метанотрофы I типа не превышали 1,7 % и относились к родам *Methylobacter*, *Methyloglobulus*, *Crenothrix*, *Methylomonas* и неклассифицированным представителям семейства *Methylomonadaceae*. Кроме того, были выявлены единичные последовательности метанотрофов II типа (*Methylocella*, *Methylocystis*).

С использованием подхода MAG аннотирован геном, родственной *Methyloglobulus morosus* (*Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142), но отличающийся от него меньшим размером (менее 2.5 Мб) (Cabello-Yeves et al., 2020). Кроме того, *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142 не был обнаружен ни в одном общедоступном пресноводном метагеноме, что может говорить об эндемичности данного микроорганизма. С помощью филогенетического анализа показано, что многочисленная ОТЕ метанотрофов образует отдельную кладу с последовательностью *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142.

Таким образом, результаты исследования показали различия в составе метанотрофных бактерий пелагических и речных образцов, а также выявили основной компонент метанооксиляющих сообществ водной толщи оз. Байкал – *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142.

Исследования выполнены при поддержке Госзадания 0279-2021-0006 ЛИН СО РАН.

НОВЫЕ ЭКСТРЕМАЛЬНО ГАЛО(АЛКАЛО)ФИЛЬНЫЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ЭВРИ-АРХЕИ ГИПЕРСОЛЕННЫХ ОЗЕР

Захарычева А. П. *, Хижняк Т. В., Ельченинов А. Г.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

*alice-keytown@ya.ru

Галофильные археи класса *Halobacteria* – доминирующая группа микроорганизмов среди обитателей гиперсоленых местообитаний, в основном аэробные гетеротрофы, способные использовать простые растворимые органические мономеры. Мало известно о разложении ими различных природных полисахаридов – целлюлозы, хитина, пектина и др. Изучение галоархей актуально для углубления знаний об их разнообразии, физиологии, особенностях метаболических путей, а также для поиска специфичных ферментов (гликозидаз) для применения в биотехнологических целях в средах с высоким содержанием соли.

Цель работы – изучение фено- и генотипических свойств 10 новых штаммов экстремальных галоархей из гиперсоленых местообитаний, а также характеристика гликозидазы GH5 из *Natronobiforma cellulositropha* AArce15.

Методом мультисубстратного анализа впервые показано, что исследованные штаммы экстремальных галоархей (HArcht1-1, HArcht3-1, HArcht3-2, HArcht-Mg, HArcht-Bsk, HArce12,

HArcel3) используют широкий спектр субстратов (моно- и олигосахара, биополимеры). Хитинотрофные штаммы HArchT-Mg и HArchT-Bsk – термотолерантные мезофилы, экстремальные галофилы и типичные нейтрофилы, целлюлотрофные штаммы HArce12 и HArce13 относятся к термотолерантным мезофилам, экстремальным галофилам и нейтрофилам.

Ген эндоглюканазы (ID 2642502327) успешно клонирован и экспрессирован в *E. coli* BL21(DE3) и *H. volcanii* DS70 ΔpurE2 для сравнения свойств белка в зависимости от системы экспрессии (бактериальной и архейной). Эндоглюканазные активности рекомбинантных белков (EndGH5_E, экспрессированный в *E. coli*, и EndGH5_H из *H. volcanii*) по отношению к КМЦ были обнаружены во фракциях растворимых белков. При проведении ДГГЭ целевой белок обнаружен в области 150 kDa, тогда как теоретическая масса белка составила 106 kDa (белки галоархей содержат увеличенное количество кислотных остатков).

Полученные результаты показали, что штаммы HArchT-Mg, HArchT-Bsk, HArce12, HArce13 являются новыми видами экстремальных галоархей. Необходимо отметить недооцененную роль галоархей в минерализации органического углерода в гиперсоленых местообитаниях.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ №20-14-00250.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЗОЛОТА НА БИОМАССУ *SPIRULINA PLATENSIS* ПРИ ЕЕ РОСТЕ В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ

Зиньковская И.^{1,2}, Чепой Л.³, Рудь Л.³, Кирияк Т.³, Джур С.³

¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, zinikovskaia@mail.ru

²Национальный научно-исследовательский институт физики и ядерной инженерии «Хория Хулубей», Бухарест-Мэгуреле, Румыния

³Институт микробиологии и биотехнологии, Кишинев, Республика Молдова

В связи с широким применением наночастиц серебра и золота в медицине и промышленности очень важно изучить их токсичность для живых организмов. На сегодняшний день существует целый ряд публикаций, в которых описано влияние высоких концентраций наночастиц металлов на различные организмы, в то время как влияние низких концентраций малоизучено. В данной работе было исследовано влияние наночастиц серебра (12 нм) и золота (4,7 нм), покрытых полиэтиленгликолем, в концентрациях 0,025–0,5 мкМ на рост биомассы *Spirulina platensis*, ее биохимический состав и антиоксидантную активность. Как показали полученные результаты наночастицы в изучаемой диапозоне концентраций стимулировали рост биомассы спирулины и незначительно повлияли на содержание белков, углеводов и вспомогательных пигментов. Изображения ПЭМ показали, что наночастицы проникают внутрь клеток и вызывают ультраструктурные изменения.

СКРИНИНГ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ЛАКТОНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Злобин И. В., Соколов М. Н., Зайцева Ю. В.*

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль,

rektorat@uniyar.ac.ru

*ily.zlobin21@yandex.ru

Введение.

Quorum Sensing (QS). системы позволяют бактериям регулировать экспрессию генов в зависимости от плотности популяции. Системы QS состоят из двух компонентов – низкомолекулярных сигнальных молекул и рецепторных белков, с которыми они связываются. Наиболее изучены QS системы грамотрицательных бактерий, использующие в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). Известно, что синтез факторов патогенности регулируется QS. Один из способов борьбы с патогенными бактериями – использование меха-

низмов подавления QS – Quorum Quenching (QQ). Представляется перспективным метод QQ основанный на использовании ферментов лактоназ, разрушающих сигнальные молекулы QS на основе лактонов.

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

Материалы и методы.

Для анализа использовали коллекцию ассоциативных микроорганизмов кафедры ботаники и микробиологии ЯрГУ. Определение АГЛ-деградирующей активности проводили с использованием биосенсора *Chromobacterium violaceum* CV026, который продуцирует фиолетовый пигмент виолацеин в ответ на присутствие в среде АГЛ. 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. Инкубировали при 30°C в течении 48 часов. Отсутствие фиолетовой окраски у биосенсора свидетельствовало о деградации АГЛ. Количественная оценка лактоназной активности производилась колориметрическим методом, основанным на способности лактонов образовывать окрашенные соединения с Fe³⁺ в присутствии гидроксилламина в щелочной среде. Идентификацию отобранных штаммов проводили молекулярно-генетическим методом на основе анализа последовательности гена 16S рРНК. Полученные последовательности были проанализированы, с помощью метода ближайших соседей (Neighbor-Joining).

Результаты и обсуждение.

В ходе исследования было проверено 65 штаммов бактерий, семь из которых обладали лактоназной активностью. Данные штаммы относятся к родам: *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*. Наибольшей лактоназной активностью обладал штамм *Rhodococcus* sp. VER 34, снизивший концентрацию АГЛ в среде на 63 %. Биоинформационный анализ генов лактоназ показал, что ферменты объединяются в группы по принципу функционального сходства, которое может иметь как дивергентный, так и конвергентный характер, что может указывать на их эволюционное происхождение.

Заключение.

В результате работы были выявлены семь штаммов, обладающих лактоназной активностью, относящиеся к филумам Firmicutes, Actinomycetes и Proteobacteria. Наличие выраженных лактоназных свойств у данных штаммов делает их перспективными объектами для дальнейших исследований.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ FOF1-АТФ-СИНТАЗЫ *BACILLUS SUBTILIS*

Зубарева В. М.^{1, 2 *}, Лапашина А. С.^{1, 2}, Третьяков Д. О.^{1, 2}, Фенюк Б. А.^{1, 2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва,

²НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

* zubareva.valeriaa@gmail.com

FOF1-АТФ-синтаза – важнейший фермент, катализирующий синтез АТФ за счет энергии трансмембранной разности электрохимического потенциала протонов. Фермент также способен и к гидролизу АТФ, который приводит к появлению на мембране разности электрохимического потенциала. АТФазная активность фермента подвержена неконкурентному ингибированию комплексом MgАДФ. Для ряда бактерий известно также ингибирование АТФазной активности С-концом субъединицы ε. Взаимодействие двух типов регуляции точно не установлено: часть авторов считает, что С-концевой домен ε-субъединицы противодействует АДФ-ингибированию, другие, напротив, предполагают, что оба типа ингибирования поддерживают друг друга.

Целью работы было изучение взаимодействия ε-ингибирования и АДФ-ингибирования в АТФ-синтазе *Bacillus subtilis*. Для этого было проведено сравнение ферментов 4 штам-

мов: дикого типа, с делецией С-концевого домена субъединицы ϵ ($\epsilon\Delta C$), с точечной заменой $\beta Q259L$, ослабляющей АДФ-ингибирование, и двойного мутанта $\beta Q259L+\epsilon\Delta C$. Сравнение проводилось на инвертированных суббактериальных частицах (СБЧ), а также на препарате очищенного комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$.

АТФазная активность СБЧ двойного мутанта оказалась практически нечувствительной к добавлению АДФ, а также сульфита, который препятствует АДФ-ингибированию. Добавление АДФ подавляло АТФазную активность СБЧ штамма $\beta Q259L$ слабее, чем в диком типе, а сульфит активировал такие СБЧ значительно слабее, чем дикий тип. На СБЧ дикого типа и $\epsilon\Delta C$ АДФ и сульфит влияли схожим образом. Таким образом, мутация $\epsilon\Delta C$ сама по себе не привела к снижению ингибиторного эффекта АДФ, однако дополнительно усилила эффект замены $\beta Q259L$, ослабляющей АДФ-ингибирование. Однако данные, полученные на препаратах очищенных субкомплексов $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$, указывают на то, что при гидролизе низких (менее 50 мкМ) концентраций АТФ субъединица ϵ может противодействовать АДФ-ингибированию.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 20-14-00268).

ПОИСК НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА АЗОТА, В ГЕНОМЕ *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS3701

Иванова Е. В.^{1,*}, Позднякова-Филатова И. Ю.², Петриков К. В.² и Ветрова А. А.²

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино

*ivanova05evgenia99@yandex.ru

Введение. В условиях дефицита азота у микроорганизмов происходит перестройка клеточного метаболизма: в клетке интенсивнее начинает работать ряд промоторов, активность которых связана с наличием сигма⁵⁴-субъединицы РНК-полимеразы, а также белком-активатором NtrC. Объектом исследования является *Pseudomonasputida* BS3701 (NZ_CP059052.1), содержащий гены, кодирующие ключевые ферменты катаболизма нафталина. В условиях дефицита азота количества мРНК этих генов увеличивается. Однако в области upstream этих генов не обнаружено сайта связывания NtrC, а механизм регуляции данного процесса неясен. Поэтому целью работы является поиск некодирующих РНК (нкРНК), участвующих в регуляции метаболизма азота в геноме *Pseudomonasputida* BS3701.

Материалы и методы. *P. putida* BS3701 выращивали в 6 биологических повторах на среде Эванс с концентрацией (NH_4Cl): 5 mM и 0,25 mM. Препараты тотальной РНК выделяли с помощью TRIzol. В качестве целевых РНК были выбраны регуляторные нкРНК, в области upstream которых с помощью программы SigmaID был обнаружен NtrC — зависимый энхансер, а с помощью iPro54-PseKNC σ^{54} — зависимый промотор.

Результаты. Отобрали 5 нкРНК: PpBS_03500 (NrsZ), PpBS_11690 (PrrB_RsmZ), PpBS_16430 (ncRNA with the narK RNA-motif), PpBS_19770 (Cobalamin riboswitch), PpBS_43580 (ncRNA with the TwoAYGGAY RNA-motif). Для PpBS_43580 (ncRNA with the TwoAYGGAY RNA-motif), не удалось подобрать праймеры, остальные же проанализировали методом RT qPCR.

Количество РНК PrrB_RsmZ при снижении концентрации хлорида аммония увеличивается в 2.4 раза (p.value = 0,0135). В литературе описано, что эта нкРНК связывается с белком-репрессором трансляции RsmA и блокирует его. Об участии в метаболизме азота информации не было.

Заключение. В дальнейшем планируется проверить участие данной нкРНК в регуляции метаболизма азота.

РАЗРАБОТКА КОНСОРЦИУМА ТЕРМОФИЛЬНЫХ И ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ КОМПСТИРОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

Ивасенко Д. А., Перченко Р. В., Рыбкин Д. С., Герасимчук А. Л., Франк Ю. А.

Общество с ограниченной ответственностью «Дарвин», Томск, bio.darwin@mail.ru

Отходы животноводческих комплексов, птицефабрик и очистных сооружений, несмотря на питательную ценность для растений, не могут быть использованы как удобрения в переработанном виде, так как являются источниками условно-патогенной микрофлоры, цист простейших и яиц гельминтов. Переработка органических отходов в компост позволяет уменьшить их объем, обеззаразить, а также повысить питательную ценность для растений. Протагонистами биологического процесса компстирования являются термофильные и термотолерантные микроорганизмы, продуцирующие гидролитические ферменты и активно окисляющие органическое вещество.

Целью работы было выделение микроорганизмов-продуцентов из органических отходов и разработка промышленного консорциума для интенсивного компстирования. Избыточный активный ил городских очистных сооружений (AS-GOS), куриный помет (PL) и свиной навоз (PM) были использованы для получения накопительных культур аэробных органотрофных микроорганизмов и деструкторов целлюлозы, при 50 °С на селективных питательных средах. Далее были выделены чистые культуры продуцентов. Изоляты идентифицировали путем секвенирования и анализа последовательностей гена 16S рРНК, близких к полным (~1450 п.н.). При отборе штаммов для консорциума учитывали непатогенность, способность к деструкции органических веществ, включая труднорастворимые полимеры, устойчивость к высоким температурам и рост в широком диапазоне рН.

Все штаммы бактерий-деструкторов органических субстратов, выделенные из активного ила и отходов животноводства на богатых питательных средах, относились к семействам Paenibacillaceae и Bacillaceae (Firmicutes). На среде с микрокристаллической целлюлозой в качестве единственного источника углерода получен штамм PM-cell, отнесенный к *Pseudoxanthomonas taiwanensis* (Gammaproteobacteria). Штамм включен в состав консорциума как термофильный сахаролитик, продуцент β-глюкозидазы, активный при высоких значениях рН. Для включения в состав промышленного консорциума были также выбраны: (1) *Anoxybacillus kamchatkensis* AS-GOS-2 – термофил, утилизирующий простые сахара и полисахариды (пектин и крахмал); (2) *Bacillus amyloliquefaciens* PL-1 – термотолерантный продуцент альфа-амилазы и протеаз; (3) *Aneurinibacillus thermoaerophilus* PL-5 термофильный органотроф, известный как продуцент липаз, щелочных целлюлаз и других гидролитических ферментов; (4) термотолерантный штамм *Brevibacillus brevis* PM-3, гидролизующий казеин и желатин.

Таким образом, разработан консорциум микроорганизмов для компстирования органических отходов, включая целлюлозосодержащие компоненты, активный в широком технологическом коридоре температур и рН.

Исследование поддержано грантом Фонда содействия инновациям по теме «Разработка технологии биоконверсии органических отходов *in situ* на основе промышленных консорциумов микроорганизмов-продуцентов» (договор №48ГРСОПР-С7-15/63638 от 11.12.2020).

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ХРОМАТОВ В ЩЕЛОЧНЫХ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ БАКТЕРИЯМИ *HALOMONAS* SP. (ШТАММ MONO)

Игнатенко А. В.¹, Хижняк Т. В.²

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, ignatenko5aiav@gmail.com

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Содержание хрома в Земной коре невелико, и составляет порядка $8,3 \times 10^{-3}$ %. Основными потребителями хрома в мире является металлургическая и химическая промышленность. Вследствие токсичного воздействия хрома на живые организмы, возникает проблема

очистки загрязненных территорий и переработки отходов. В большинстве случаев, работы направлены на восстановление наиболее токсичного Cr^{6+} в менее токсичный Cr^{3+} , причем биологические методы очистки являются одними из перспективных в этой области.

Цель работы: изучить морфо-физиологические особенности бактерий *Halomonas* при росте и восстановлении токсичного хромата, оценить возможность использования галоалкалофильных бактерий для биоремедиации.

Лабораторные эксперименты со штаммом нитрат редуцирующей факультативно анаэробной галоалкалофильной бактерии *Halomonas sp.* (штамм Моно), выделенной из озера Моно, США, проводили с применением карбонатно-бикарбонатной среды (pH \approx 10, соленость по $\text{Na}^+ \approx$ 1M). В качестве донора и акцептора электронов использовали ацетат и K_2CrO_4 .

Установлено, что восстановление хроматов с образованием нерастворимого осадка идет только в анаэробных условиях. Эффективность восстановления хрома достигает 100 % при концентрациях до 15 мг Cr/л. Дальнейшее увеличение концентрации хроматов в среде ведет к снижению скорости роста и количества биомассы. Оптимум температуры активного восстановления хромата лежит в районе 37 °C, солености 1–2 M, при pH среды 9–10, при этом и при 4M солености возможно восстановление хроматов бактериями. В присутствии хроматов клетки удлиняются, появляется неоднородность по окраске, встречаются цепочки из неразшедшихся клеток. Методом рентгеновского микроанализа предложен состав осадка – $\text{NaCl} + [\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$.

Таким образом, исследованная бактерия обладает высокой устойчивостью и восстановительной способностью по отношению к токсичным хроматам. В сочетании с внеклеточной локализацией осадка Cr(III), бактерию рода *Halomonas sp.* штамм Моно можно считать перспективной в целях биоремедиации природных и сточных вод с высокой соленостью и щелочностью.

ПЛАЗМИДЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

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

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, adm@ibpm.pushchino.ru
*tatiz@ibpm.pushchino.ru

Введение. Бактерии рода *Pseudomonas* способны эффективно колонизировать практически все экологические ниши, в том числе живые объекты. Природные штаммы *Pseudomonas spp.* обладают естественной резистентностью к ряду антибиотиков, под селективным давлением они приобретают детерминанты множественной лекарственной устойчивости и способны к их эффективной передаче.

Целью данной работы было изучение роли плазмид в распространении детерминант антибиотикорезистентности у штаммов псевдомонад городской окружающей среды.

Материалы и методы. В работе использовали антибиотикорезистентные изоляты, полученные методом прямого высева. Идентификацию проводили с использованием системы MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия). Штаммы тестировали на наличие плазмид методами: выделение ДНК, конъюгационный перенос плазмид и ПЦР *rep*-областей IncP-1, P-9, P-4 (IncQ), IncW, IncN и P-7. Нуклеотидные последовательности определяли с помощью ABI 3130xl Analysis System (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение. Создана коллекция из 120 антибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas spp.*, 89 % из которых обладают устойчивостью к трем и более антибиотикам. 50 штаммов содержат конъюгативные плазмиды устойчивости к тетрациклину и/или стрептомицину, 6 из которых также несут гены резистентности к гентамицину. У одного штамма обнаружена плазида IncP-1, у четырёх – IncN, семь штаммов содержат плазмиды IncP-9ε, семь – IncP-7 плазмиды. Исследован плазмидный контроль резистентности к тетрациклину, показано, что в штаммах *Pseudomonas spp.* городской среды преобладают гены *tetA/tetC*, контролирующие активный вывод антибиотика из клетки.

Выводы. Впервые обнаружены IncP-9 плазмиды устойчивости к тетрациклину, стрептомицину и гентамицину одновременно, и конъюгативная IncP-7 плазида устойчивости к тетрациклину. Полученные данные расширяют наши представления о роли P-7 и P-9 плазмид в распространении детерминант устойчивости к антибиотикам.

УСЛОВИЯ МАКСИМАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ PII БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ *LENTILACTOBACILLUS HILGARDII*

Исхакова З. И., Журавлева Д. Э., Черемушкина В. А., Каюмов А. Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, zalinunya@mail.ru

Бактериям для осуществления нормальной жизнедеятельности необходимо постоянно адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Для этого организмы должны быть способны оценивать доступность источников энергетического питания и макроэлементов (углерода/азота) в среде. Как правило, у большинства бактерий метаболизм азота регулируется PII-подобными белками, которые в ответ на изменения внутриклеточного соотношения АТФ, АДФ, кетоглутарата и глутамина изменяют свою конформацию и сродство к белкам-мишеням. Интересно, что из более чем 400 известных видов *Lactobacillaceae* только семь содержат в геноме гены PII-подобных белков, которые относятся к новому подсемейству PII белков PotN. В *Lentilactobacillus hilgardii* PotN взаимодействует с АТФ и АДФ и по всей видимости является сенсором доступности энергетического питания. Целью работы являлось определить условия максимальной экспрессии гена *potN* в клетках *L. hilgardii*.

Клетки *L. hilgardii* выращивали в течении ночи на среде MRS, переносили в синтетическую среду с различными источниками азота (2 или 20 мМ глутамин, глутамат, спермидина, NH_4Cl или KNO_3) и культивировали в течении шести часов. После чего оценивали экспрессию гена *potN* с помощью ПЦР в режиме реального времени. Глутамат и глутамин подавляют транскрипцию гена *potN*, в то время как ионы аммония и нитратов не оказывают влияния и уровень транскрипции гена *potN* оставался на уровне с контролем. Максимальный уровень экспрессии гена наблюдался при росте со спермидином.

Максимальная экспрессия гена *potN* в присутствии в среде спермидина, по-видимому, связано с тем, что ген белка располагается в опероне транспортера полиаминов *potABCD*. Вероятно, белок PotN регулирует активность комплекса и перекрывает поступление спермидина в клетку.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

SAM46 И SAM112, БАКТЕРИОФАГИ НОВОГО РОДА «SAMARAVIRUS» С НЕОБЫЧНОЙ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРОЙ МАЛОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕРМИНАЗЫ

Казанцева О. А.*, Пилигримова Э. Г., Шадрин А. М.

Лаборатория биологии вирусов бактерий, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, Пущинский научный центр биологических исследований РАН, ФИЦ, Пущино
*Olesyakazantseva@bk.ru

Введение. В силу распространенной проблемы антибиотикорезистентности бактерий, бактериофаги или их белки часто упоминают в качестве альтернативы или основы для разработки новых противомикробных препаратов. Однако фаговая трансдукция, являющаяся одним из механизмов горизонтального переноса генов, может стать проблемой при фаговой терапии и требует детального изучения.

Материалы и методы. Исследование проводилось с помощью ряда классических методов по работе с фагами и оценки их физиологических характеристик: выделение, опре-

деление специфичности, рН- и термо- стабильности, NGS, рестрикционного анализа, ТЭМ, определение скорости адсорбции, латентной фазы, числа потомства, сравнительной геномики, филогенетического анализа и других.

Результаты и обсуждение. В данной работе мы описываем новые вирулентные фаги vB_VcM_Sam46 и vB_VcM_Sam112 (Sam46 и Sam112, соответственно), проявляющих литическую активность в отношении группы *Bacillus cereus*. Sam46 и Sam112 были выделены из образцов почвы (г. Самара). По морфологическому анализу фаги имеют морфотип миовируса. Геномы Sam46 и Sam112 содержат дцДНК с длиной 45419 п.н. и 45037 п.н., соответственно, и одинаковым GC-составом 41,6 %. Sam46 и Sam112 имеют высокий уровень полногеномной идентичности (96,0 %), что указывает на принадлежность фагов к одному виду. Согласно филогенетическому анализу, Sam46 и Sam112 образуют отдельную кладу значительно удаленную от ближайших родственных фагов SPP1 and D6E. Малая субъединица терминазы Sam46 и Sam112 обладает двухдоменной структурой: типичным C-концевым доменом Terminase_2 (107-230 а.о.) и N-концевым доменом FtsK_gamma (11-70 а. о.), последний ранее не был описан как часть малой субъединицы терминазы. Согласно филогенетическому анализу, FtsK_gamma домены Sam46 и Sam112 родственны FtsK_gamma доменам *B. cereus* и *B. subtilis* белков SpoIIIE, участвующих в делении бактериальных клеток и сегрегации хромосом. Предполагается, что малая терминаза фагов может связываться с сайтами-ДНК хозяина, что приводит в конечном итоге к ошибочной упаковке в головку фага бактериальной ДНК, и таким образом способствует горизонтальному переносу генов.

Выводы. Sam46 и Sam112 в соответствии с критериями таксономической классификации фагов, являются членами нового рода 'Samaravirus' и, по всей видимости, нового подсемейства.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00300.

ВЛИЯНИЕ ФОРМИАТА И ФОЛАТА НА АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ АНАММОКС-СООБЩЕСТВА

Каллистова А. Ю., Николаев Ю. А., Грачев В. А., Белецкий А. В., Груздев Е. В., Кадников В. В., Дорофеев А. Г., Равин Н. В., Марданов А. В., Пименов Н. В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, info@fbras.ru

*kallistoanna@mail.ru

Анаммокс-бактерии играют ключевую роль в круговороте азота в природе и используются в биотехнологии для очистки сточных вод от аммония. Чувствительность этих бактерий к изменениям внешних условий является частой причиной сбоев в работе реакторов на очистных сооружениях. Поскольку формиат служит для анаммокс-бактерий дополнительным субстратом, а фолат, являясь вторичным метаболитом различных протеобактерий, может способствовать увеличению скорости удаления азота, мы предположили, что внесение формиата и фолата окажет стимулирующее воздействие на анаммокс-бактерии, что в свою очередь приведет к стабильности процесса анаммокс в условиях резкого увеличения нагрузки по аммонии, т. е. поможет преодолеть стрессовый фактор.

Влияние формиата и фолата на активность и состав анаммокс-сообщества исследовали с использованием лабораторной установки, состоящей из 3-х параллельно работающих реакторов SBR-типа с загрузкой. В один реактор был добавлен формиат, во второй – фолат, третий реактор служил контролем. В процессе работы во всех реакторах увеличивали нагрузку по аммонии в 2 раза. Было выполнено 2 запуска реакторов; между запусками смешанный образец биомассы хранили в течение 3-х мес при +4 °С без внесения источников азота. Концентрацию минеральных форм азота определяли аналитическими методами; состав микробного сообщества – методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

Во время первого запуска выявлено стимулирующее влияние фолата на суточное количество удаленного азота (dN). Добавление формиата приводило к снижению концентрации нитрата в очищенной воде по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о про-

текции процесса диссимиляционной нитратредукции. Во время второго запуска, наоборот, стимулирующее влияние на dN оказывал формиат. Разное влияние фолата и формиата на dN во время первого и второго запусков мы связываем с разным эффектом этих веществ на доминирующие в сообществе роды анаммокс-бактерий. В инокуляте и на загрузке всех реакторов доминировали анаммокс-бактерии рода *Ca. "Brocadia"*. Внесение формиата во время первого запуска стимулировало развитие анаммокс-бактерий рода *Ca. "Jettenia"*. Обильное образование экзополимерных соединений и, возможно, большая устойчивость к кислороду позволили им закрепиться и нарастить биомассу на стенке реактора, благодаря чему произошло пространственное разделение 2-х конкурирующих за субстраты видов анаммокс-бактерий: *Ca. "Brocadia"* – на загрузке, *Ca. "Jettenia"* – на стенке реактора. Большая устойчивость анаммокс-бактерий рода *Ca. "Jettenia"* к голоданию во время хранения дала им селективное преимущество над представителями рода *Ca. "Brocadia"*, что привело к смене доминирующих в сообществе родов анаммокс-бактерий. Во время второго запуска, при общей стабильности процесса анаммокс, в сообществе уже доминировали представители рода *Ca. "Jettenia"* и на загрузке, и стенке всех реакторов.

Работа частично финансировалась из средств гранта РФФИ № 18-29-08008.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ – ОСНОВНОЙ ФАКТОР СНИЖЕНИЯ ИНСЕКТИЦИДНОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Калмыкова Г. В.* , Акулова Н. И., Соколова Э. С., Андреева И. В.

Сибирский федеральный научный агробиотехнологий РАН, Краснообск

*gvkalmyk@mail.ru

Препараты на основе бактерий *Bacillus thuringiensis* признаны самыми безопасными и успешными биоинсектицидами последнего столетия. Регуляцию численности чешуекрылых насекомых – вредителей сельского хозяйства и леса в России проводят биологическими препаратами на основе бактерий *B. thuringiensis ssp. kurstaki*. Показано, что для контроля проблемных вредителей семейства капустных: совок, капустной моли более эффективны штаммы *B. thuringiensis ssp. aizawai*. Эффективность и специфичность действия бактерий *B. thuringiensis* обусловлена наличием дельта-эндотоксина, синтезируемого в виде параспоральных включений разных форм и размеров. Стабильный синтез инсектицидного дельта-эндотоксина затруднен из-за гетерогенности популяции, возникающей при глубинном культивировании штамма-продуцента.

При глубинном культивировании штамма *B. thuringiensis ssp. aizawai* (депонирован в ВКПМ, регистрационный номер В-14026) в рассевах на агаризованной среде была обнаружена морфологическая неоднородность.

Каждый морфологический вариант штамма был изолирован и выращен как чистая культура. Вариант, образующий крупные белые колонии с ветвистым краем, был обозначен как вариант В1; крупные белые плотные колонии с сильно изрезанным краем – как вариант В2; плотные белые колонии среднего размера диаметром до 15 мм с ровным краем – как вариант Р. Микроскопия колоний трех морфовариантов показала, колониях морфовариантов В1 и В2 формировались крупные параспоральные включения бипирамидальной и неправильной шестигранной формы, соответственно, мелкие бипирамидальные кристаллики образовывали культуры морфовара Р.

Практическая значимость наших наблюдений при изучении гетерогенности штамма *B. thuringiensis ssp. aizawai* была подтверждена в опытах на гусеницах капустной моли. Штаммы морфоваров В1 и В2 проявляли высокую энтомопатогенность в отношении гусениц капустной моли, а штаммы варианта Р были нетоксичны для этих гусениц.

Таким образом, мы установили, что инсектицидность штамма *B. thuringiensis ssp. aizawai* связана с фенотипом морфологии колоний и наличием крупных параспоральных включений бипирамидальной и неправильной шестигранной формы. Возникающие при глубинном культивировании клетки морфовара Р снижают биологическую эффективность культуральной жидкости штамма-продуцента.

ГЛИКОЗИЛГИДРОЛАЗА PSSW *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* ДЕПОЛИМЕРИЗУЕТ КИСЛЫЙ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ЭКЗОПОЛИСАХАРИД ДО НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ

Канапина А. Ш.¹, Марченков В. В.², Сурин А. К.², Ивашина Т. В.¹

¹ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пущино, ivashina@ibpm.pushchino.ru

²ФГБУ Институт белка РАН, Пущино

Кислые экзополисахариды (ЭПС) клубеньковых бактерий играют ключевую роль в установлении эффективного симбиоза с бобовыми растениями. Как и у других микроорганизмов ЭПС участвуют в образовании биопленок, защите бактерий от абиотических стрессов и подавлении защитных систем растения-хозяина. Роль низкомолекулярных ЭПС в симбиозе, а также механизмы их образования во многом не ясны. Полагают, что наряду с Nod-факторами, продукция и структура экзоолигосахаридов (ЭОС) определяет специфичность взаимодействия с растением-хозяином. Выяснение механизмов процессинга ЭПС, а также структурных особенностей экзоолигосахаридов открывают перспективы для дальнейшего изучения механизмов их функционирования в симбиозе в качестве сигнальных молекул.

Ранее нами было высказано предположение, что в образовании ЭОС у штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 участвует комплекс гидролитических ферментов, кодируемых генами *pssW* и *plyABC*. Цель настоящего исследования – анализ ЭОС, образующихся в результате гидролиза высокомолекулярного ЭПС периплазматической гликозилгидролазой PssW *in vitro*.

Результаты масс-спектрометрического анализа позволили заключить, что ЭОС из трёх основных фракций, полученных после хроматографического разделения продуктов гидролиза ЭПС, являются соответственно моно-, ди- и тримерами повторяющегося октасахаридного звена ЭПС, которые отличаются уровнем ацетилирования и наличием гидроксипутаноильных групп. Показано, что на восстанавливаемом конце главной цепи мономера расположены последовательно два остатка *D*-GlcA, на не восстанавливаемом конце – остаток *D*-Glc. Наряду с октасахаридами на спектрах выявлена серия ионов гептасахаридов без ацетилируемого остатка *D*-GlcA. Сравнительный анализ спектров ионов октасахаридов и гептасахаридов свидетельствует о том, что основным сайтом гидролиза PssW является $\beta(1-4)$ гликозидная связь между ацетилируемым остатком GlcA и остатком *D*-Glc в главной цепи ЭПС. С меньшей эффективностью PssW расщепляет связь между двумя остатками *D*-GlcA, при этом наличие ацетильных групп рядом с сайтом гидролиза влияет на эффективность деполимеризации. Отсутствие гептасахаридов (без остатка *D*-GlcA) у штамма VF39 с нокаутом гена *pssW* подтверждает полученные данные о сайтах гидролиза EPS.

ПОИСК ТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Карасева Э. В., Моисеева Е., Волченко Н. Н., Самков А. А., Вотчель Д., Худокормов А. А.

Кубанский государственный университет, Краснодар, biotech@kubsu.ru

В агробиотехнологии серьезной проблемой является восстановление плодородия почв и очистка окружающей среды от внешних поллютантов и накапливаемых продуктов переработки растительного и животного происхождения. Микробные экобиотехнологии в этом случае выходят на первый план. Цель работы: проверить жизнеспособность и биотехнологический потенциал лиофилизированных бактериальных культур, заложенных на хранение в 2001–2003г.г. В работе использованы классические микробиологические и биохимические методы. Исследованы свойства свыше 250 коллекционных штаммов как углеводородокисляющих, так и сателлитных. Установлено, что у большинства штаммов, хранившихся в лиофилизированном состоянии более 20 лет, оставались присущие им до закладки на хранение

фенотипические свойства и способность к деградации нефти. Изученные штаммы показали значительное родовое и видовое разнообразие, хотя и были представлены в основном филами *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, родами: *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Deitzia*, *Lysinibacillus*, *Micrococcus*, *Mycrobacterium*, *Nocardioides*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* и др. Большинство родов представлено несколькими видами. У 52 нефтеокисляющих штаммов оценена способность к окислению индивидуальных углеводородородов С7–С17, которая не всегда коррелирует с активностью окисления сырой нефти. У всех штаммов проанализирована целлюлолитическая, протеолитическая и липолитическая активность. Целлюлозоразлагающая активность была присуща чаще бациллярным штаммам, выделенным ранее из буровых растворов и почвогрунтов. Коллекционные культуры (77 %) проявили высокую активность в отношении деградации растительных и животных жиров разного агрегатного состояния. Наибольшее количество липолитиков обнаружено среди актинобактерий порядков *Corynebacteriales* и *Micrococcales*. 60 % всех штаммов обладали протеолитическими ферментами и разлагали белки с разной степенью эффективности. Наибольшей активностью обладали представители родов *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*. Некоторые штаммы обладали высокой эффективностью как липолиза, так и протеолиза. Отобраны перспективные штаммы для целей экологической микробиологии.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОФИТЫ ВИНОГРАДА, КУЛЬТИВИРУЕМОГО В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Карпова Д. В.^{1,*}, Карасева Э. В.¹, Белкина Д. Д.², Арзамазова К. А.¹,
Худокормов А. А.¹, Юрченко Е. Г.²

¹Кубанский государственный университет, Краснодар
*karpovadv9@mail.ru

²Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия,
Краснодар, daria.microbiology@yandex.ru

Эндофитные бактерии представляют собой перспективный объект агробιοтехнологии. Известно, что многие виды бактерий участвуют в поддержании неспецифического иммунитета растений, стимулируют рост и повышают их толерантность к стрессам. Успешная манипуляция полезными бактериями в перспективе может значительно улучшить урожайность и устойчивость винограда к заболеваниям.

Цель данного исследования – изучение разнообразия бактерий, ассоциированных с проводящими тканями виноградной лозы.

Объекты исследования – растения винограда, произрастающего на территории Анапо-таманской зоны виноградарства Краснодарского края, и ассоциированные с ними эндофитные бактерии. Небольшие фрагменты проводящих органов (древесных частей – рукавов и однолетних побегов) после поверхностной стерилизации растирались в стерильной ступке с битым стеклом и физраствором. Полученную суспензию высевали на плотные питательные среды (МПА, R₂A, среда Кинга). Для идентификации изолятов применялись классические микробиологические и хромато-масс-спектрометрические методы.

Всего было выделено в чистую культуру более 170 бактериальных штаммов, 117 из них идентифицированы по белковому профилю методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Было отмечено присутствие 18 родов бактерий: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Sphingomonas*, *Curtobacterium*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Cellulosimicrobium*, *Brevundimonas*, *Rothia*, *Dietzia*, *Paenibacillus*. Неидентифицированные культуры по совокупности признаков в соответствии с современной филогенетической систематикой отнесены к классам *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteriia*. Большинство идентифицированных бактериальных изолятов входило в филум *Firmicutes*, в меньшем количестве были представлены штаммы, относящиеся к филумам *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (класс *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*). Семейство *Bacillaceae* выступало наиболее многочисленной и разно-

образной группой ассоциированных с виноградной лозой эндофитных бактерий. Наиболее часто отмечалось присутствие в сосудистом пучке виноградной лозы культур таких видов, как *Bacillus mojavensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*.

Перспективными с точки зрения использования в практических биотехнологиях виноградарства представляются виды бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Paenibacillus*.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ Pi-ТРАНСПОРТЕРОВ *pstS1* И *pstS2* У АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *NOSTOC* SP. PCC 7120

Карпова О. В.* , Виноградова Е. Н., Селях И. О., Семенова Л. Р., Горелова О. А.,
Соловченко А. Е., Лобакова Е. С.

МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru
*karpova_ov@mail.bio.msu.ru

Интерес к регуляции поглощения и метаболизма ортофосфата (Pi) у цианобактерий связан с их способностью адаптироваться к широко варьирующей доступности Pi в среде – от полного его отсутствия до токсичных концентраций.

У модельных цианобактерий, *Synechosystis* sp. PCC 6803 (далее PCC 6803) и *Nostoc* sp. PCC 7120 (далее PCC 7120), ассимиляция Pi осуществляется по механизму, близкому к такому у *Escherichia coli*. Pi-зависимый транскрипционный фактор SphR запускает экспрессию Pho-регулона – комплекса генов, промоторы которых содержат участки связывания SphR. В состав Pho-регулона PCC 6803 входят два оперона *pstS--C--A--B*, кодирующие Pi-транспортеры, *pst1* и *pst2*. У PCC 7120 из двух оперонов Pi-транспортеров только *pst1* считается SphR-регулируемым. Цель исследования – сравнительный анализ экспрессии *pstS1* и *pstS2* у PCC 7120 при фосфорном голодании культуры в присутствии азота в среде или без него.

Культуру *Nostoc* sp. PCC 7120 исходно выращивали либо в полной BG-11, либо в безазотной среде BG-110, после чего переносили в соответствующую среду без фосфата. После двух суток инкубации в отсутствие Pi из культур выделяли суммарную РНК и получали кДНК. ПЦР в реальном времени выполняли на приборе QuantStudio Flex 7 (Applied Biosystems).

При фосфорном голодании в присутствии нитрата в среде уже через 2 суток экспрессия *pstS* увеличивается на 1–2 порядка, причем количество транскрипта *pstS2* ($\times 512$) почти в 20 раз превышает количество транскрипта *pstS1* ($\times 28$). Напротив, при фосфорном голодании в безазотной среде экспрессируется преимущественно *pstS1* ($\times 4,5$), а экспрессия *pstS2* остаётся на уровне контроля ($\times 1,4$). При этом остается неясным механизм индукции гена *pstS2*, не входящего в Pho-регулон у PCC 7120. Неожиданные результаты анализа экспрессии *pstS1* и *pstS2* у PCC 7120 указывают на возможную регуляцию оперона *pst2* азотным метаболизмом.

Ранее методом анализа *in silico* было показано, что промотор оперона *pst2* (но не *pst1*), контролирующей экспрессию гена *pstS2*, содержит участок связывания транскрипционного фактора NtcA -- основного регулятора азотного метаболизма. Известно, что NtcA-связывающие участки имеются как в индуцируемых, так и в репрессированных генах. Например, NtcA-зависимая репрессия описана для гена *rbcl* при diazotрофии, а в гене сайт-специфической рекомбиназы *xisA* область промотора, узнающая NtcA, участвует и в репрессии *xisA* в вегетативных клетках, и в NtcA-зависимой индукции этого гена при дифференцировке гетероцист.

Таким образом, предлагаемая новая модель регуляции экспрессии *pstS2* *Nostoc* PCC 7120 предполагает высокую экспрессию гена за счет NtcA-зависимой активации в присутствии азота, возможно, наряду с другими регуляторными механизмами. В diazотрофных условиях возможно использование NtcA-связывающего участка промотора *pstS2* для его частичной репрессии. Фосфатная регуляция транспортера *pst1* и азотная регуляция транспортера *pst2* могли бы служить для тонкой настройки ассимиляции фосфора при меняющейся доступности элементов минерального питания в окружающей среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-25050мк).

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ *SALMONELLA ENTERICA* В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ

Катаев В. Я.^{1,*}, Гоголева Н. Е.^{1,2}, Балкин А. С.², Плотников А. О.¹, Черкасов С. В.¹,
Гоголев Ю. В.².

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, icis-ofrc@list.ru

²Казанский институт биохимии и биофизики, ФНЦ КазНЦ РАН, Казань,

kibmail@kibb.knc.ru

*vladimir0334@yandex.ru

Введение

Выживание патогенных бактерий во внешней среде связано со способностью преодолевать стресс, вызванный голоданием. Бактериальный ответ на голодание хорошо изучен в лабораторных культурах с достаточно высокой плотностью клеток, однако бактериальные популяции часто имеют небольшой размер, когда сталкиваются с недостатком питательных субстратов в естественных биотопах.

Целью данной работы было выяснить, существуют ли различия в транскриптомах *S. enterica* в зависимости от фактора плотности клеток при голодании.

Материалы и методы

В качестве модельного организма использовали штамм *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар *Typhimurium* (ATCC 14028). После 12-часового культивирования в LB-бульоне при 37 °С клетки сальмонелл трижды отмывали и переносили в минеральную среду АВ, содержащую 1,0 г/л NH₄Cl; 0,62 г/л MgSO₄×7H₂O; 0,15 г/л KCl; 0,013 г/л CaCl₂ × 2H₂O; 0,005 г/л FeSO₄ × 7H₂O, pH — 5,5. Культуры инкубировали в условиях голодания с начальной плотностью популяции 10³ или 10⁹ КОЕ/мл в стеклянных флаконах при 28 °С в течение 4–96 ч перед отбором образцов.

Бактериальные клетки собирали фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США). Тотальную РНК выделяли согласно протоколу ExtractRNA (Евроген, Россия). Для подготовки библиотек кДНК использовали набор NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (NEB, США). Библиотеки секвенировали на одной дорожке проточной ячейки секвенатора HiSeq 2500 (Illumina, США).

Результаты и обсуждение

При росте клеток *S. enterica* на минимальной среде с низкого титра активируются биологические пути, связанные с использованием альтернативных источников получения углерода и энергии. Достоверно увеличивается экспрессия систем утилизации жирных кислот (оперон *Fad*), фосфолипидов клеточной мембраны (оперон *EutA-T*). Помимо этого, происходит увеличение экспрессии генов биопленкообразования и биосинтеза экзополисахаридного матрикса (оперон *WcaA-M*).

При голодании *S. enterica* с высокого титра в основном активируются стандартные биологические пути получения углерода и энергии. В то же время численность популяции жестко регулируется множеством репрессоров и ингибиторов транскрипции, такими как *SxpR*, *MarR*, *MprA*, *MarA*, *LexA*, *MelR*, *PhoBRU*.

Кроме того, состояние голодания как с низкого, так и с высокого начального титра характеризуется увеличенной экспрессии систем патогенности, в частности системы секреции 3 типа (*SSI-1, 2*).

Заключение

Было выяснено, что популяции сальмонелл низкой и высокой плотности используют различные стратегии выживания в олиготрофных условиях.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ СУПРЕССИВНОГО ФЕНОТИПА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Кашко Н. Д.^{*}, Кнорре Д. А.

НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва, fxb@genebee.msu.su
[*nataliya.kashko@gmail.com](mailto:nataliya.kashko@gmail.com)

Накопление митохондриальных ДНК (мтДНК), содержащих спонтанные делеции, в клетках грибов, например, *Podospora anserina*, обуславливает клеточное старение и приводит к отмиранию мицелия. В нашей работе мы исследовали закономерности распространения вариантов мтДНК, содержащих обширные делеции, в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – удобном модельном объекте, относящимся к факультативным анаэробам и потому не нуждающимся в наличии полного набора митохондриальных генов для существования. Для этого мы смоделировали условия, в которых возможна внутриклеточная конкуренция разных вариантов мтДНК, скрещивая штамм дрожжей, содержащий мтДНК дикого типа (rho^+), со штаммами дрожжей, несущими мутантные варианты мтДНК (rho^-). При этом в зиготе оказывалось несколько вариантов мтДНК. Проанализировав долю потомков таких зигот, утративших rho^+ мтДНК, через несколько поколений, мы оценили динамику сегрегации rho^- и rho^+ мтДНК для 24 различных вариантов rho^- мтДНК. Согласно нашим данным, варианты мтДНК со спонтанной делецией участка последовательности в среднем увеличивают свое количество копий в клетке за одно деление в 1,3 раза относительно rho^+ варианта. Для исследованных нами rho^- вариантов мтДНК мы также определили положение делеций и среднее число копий мтДНК на клетку в исходных гаплоидных штаммах, содержащих только rho^- мтДНК. Наша работа показывает, что мутантные варианты мтДНК грибов, снижающие приспособленность на уровне целой клетки, могут обладать значительным преимуществом в пределах клетки, достаточным для вытеснения мтДНК дикого типа в череде поколений.

Мы выражаем благодарность С. К. Гарушянц, Ю. Е. Караваевой, Е. С. Глаголевой и М. Д. Логачевой за помощь в подготовке образцов, секвенировании и анализе данных. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00782.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК В ПОПУЛЯЦИИ ДРОЖЖЕЙ ПОВЫШАЕТ ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРИРОДНЫМ МАКРОЛИДНЫМ АНТИМИКОТИКАМ

Киреева Н. А.¹, Соколов С. С.², Смирнова Е. А.², Галкина К. В.^{1,2}, Северин Ф. Ф.²,
Кнорре Д. А.^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, Ленинские им. М. В. Ломоносова

²Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова

У некоторых микроорганизмов процессы, происходящие перед их гибелью, регулируются генами - гомологами апоптотических генов многоклеточных животных. При этом гибель отдельно взятых клеток в микробном сообществе может быть полезна для остальных клеток: например, приводить к высвобождению в окружающую среду питательных веществ или соединений, сигнализирующих соседним клеткам об опасности. Мы предположили, что нежизнеспособные клетки дрожжей могут защищать живые клетки от некоторых природных стрессов. Чтобы проверить это предположение, мы сравнили изменение выживания прототрофных клеток *Saccharomyces cerevisiae* при воздействии различных стрессов при добавлении избытка живых, либо мертвых ауксотрофных клеток. Мы выяснили, что мертвые клетки, по сравнению с живыми, в большей степени способствуют повышению устойчивости дрожжевой популяции к макролидным антимикотикам, в частности, амфотерицину В (AmB) и фи-

липину. Мертвые клетки дрожжей абсорбировали больше филипина в сравнении с контролем за счет увеличения доступности внутренних мембран, содержащих стерина. Кроме того, добавление клеток, сверхчувствительных к AmB, способствовало выживанию клеток дикого типа в присутствии летальных концентраций AmB. Мы предполагаем, что гетерогенность чувствительности клеточной популяции к AmB может быть адаптивным механизмом устойчивости дрожжей к природным макролидным антимикотикам.

Работа выполнена за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00151).

МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ ДРОЖЖЕЙ ОТ КСЕНОБИОТИКОВ, ОСНОВАННЫЙ НА РАБОТЕ АВС-ПЕРЕНОСЧИКОВ: ВНУТРЕННИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ

Кнорре Д. А., Галкина К. В.,

НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва,
knorre@belozersky.msu.ru

Микроорганизмы сталкиваются с большим разнообразием токсичных соединений и имеют несколько универсальных (неспецифических) механизмов защиты от них. В частности, пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* полагаются на работу переносчиков семейства АВС с широкой субстратной специфичностью (АВС-переносчики). Эти переносчики выбрасывают токсичные соединения из цитоплазмы за счет энергии гидролиза АТФ. Повышенная активность таких неселективных переносчиков обуславливает лекарственную резистентность патогенных видов дрожжей. Мы предположили, что ксенобиотики, адресованные в митохондрии, могут преодолевать защиту клетки, связанную с работой АВС-переносчиков, так как будут недоступны для переносчиков плазматической мембраны. Однако липофильные катионы, оказались индукторами генов АВС-переносчиков, и эффективно откатывались из клетки вне зависимости от их способности попадать в митохондрии. Поскольку АВС-переносчики дрожжей гидролизуют АТФ даже в отсутствие транспортируемого субстрата, дефицит АТФ может сделать их работу токсичной для клетки. Чтобы проверить это мы делетировали гены транскрипционных факторов *PDR1* и *PDR3* – активаторов АВС-переносчиков. Полученный штамм оказался сверхчувствительным к антимикотикам, но был устойчив к разобщителям дыхания и фосфорилирования – протонофорам. Мы предполагаем, что избыточная активность АВС-переносчиков в присутствии протонофоров может приводить к оттоку из клеток интермедиатов метаболизма, а также нарушать барьерную функцию липидного бислоя плазматической мембраны. Суспензионные культуры дрожжей гетерогенны по содержанию АВС-переносчиков. Вероятно, это позволяет клеткам распределять риски, связанный с негативными последствиями избыточной активности АВС-переносчиков.

МИКРОБИОТА *APIS MELLIFERA* КАК СИСТЕМА ИММУНИТЕТА

Кокшарова О. А.¹, Монахова М. А.²

¹НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Биологический факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Природное разнообразие и метаболическая активность пчелиной микробиоты определяют индивидуальный и социальный иммунитет пчелиной семьи. В связи с явлением коллапса (разрушение пчелиных семей) в мире значительно усилился интерес к изучению механизмов естественной устойчивости пчел и роли её микробиоты в этом процессе. При изучении микробиоты пчел секвенирование генов 16S рРНК сочетается с метагеномным секвенированием. Первый подход используется для определения таксономического состава

и биоразнообразия микробного сообщества. Второй подход используется для определения функциональных возможностей идентифицированных микроорганизмов. Кишечное микробное сообщество медоносных пчел специфично и хорошо пространственно организовано. Видовой состав микробиоты кишечника пчел ограничен, его населяют девять доминирующих видов бактерий, относящихся к пяти группам: *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus Firm-4* и *Lactobacillus Firm-5*, которые характеризуются большой степенью внутривидового разнообразия на уровне штаммов. Бактерии *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Apibacter adventoris* и *Parasaccharibacter apium* иногда также присутствуют в различных количествах. Грамотрицательные бактерии составляют 70 % микробиоты *Apis mellifera*, причем преобладающими видами являются *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* и представители типа *Proteobacteria*. Среди грамположительных бактерий, составляющих 30% микробиоты, наиболее распространены *Lactobacillus Firm-4*, *Lactobacillus Firm-5*, *Bifidobacterium asteroides*. Микробиота выполняет множество различных функций, обеспечивая важнейшие процессы жизнедеятельности пчелы. Она участвует не только в процессах пищеварения, питания, детоксикации, но и играет важную роль в реализации защитных механизмов пчелиной семьи в процессе противостояния многочисленным патогенам, в антибактериальной, антигрибковой и антивирусной защите, непосредственно или путём активации иммунных механизмов защиты. Особого внимания заслуживают данные об изменениях микробиоты под действием антибиотиков и ксенобиотиков антропогенного происхождения. Дисбактериоз может привести к внезапному размножению условно-патогенных организмов (патобионтов), уже присутствующих в кишечнике пчелы. Изменения кишечного бактериального сообщества могут влиять на экспрессию генов, активность белков и общий метаболизм всей кишечной микробиоты. Метагеномный анализ колоний с синдромом коллапса колоний показал увеличение относительной численности бактерий *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, а также лактобацилл и уменьшение количества альфапротеобактерий и бифидобактерий по сравнению со здоровыми ульями. Таким образом, необходимо учитывать, что соотношение отдельных видов микробиоты имеет решающее значение для будущей структуры и функционирования микробиоты организма в целом и, в конечном счете, в активности его иммунитета. Общность состава микробиоты пчелы и человека, позволяет использовать микробиоту пчелы медоносной как модель для решения ряда общебиологических проблем.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПОВЫШЕНИЮ СЕЛЕКТИВНОСТИ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ СТЕРОИДОВ МИКРОМИЦЕТОМ *Drechslera* sp. Ph F-34

Коллеров В. В., Тарлачков С. В., Шутов А. А., Донова М. В.

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

Мицелиальные грибы эффективно осуществляют гидроксилирование неактивных углеродных атомов стероидных соединений, преимущественно, за счет наличия специфических цитохром Р450-монооксигеназ. Однако наличие в цельноклеточных катализаторах сопутствующих ферментативных активностей приводит к снижению селективности целевых реакций. Решение проблемы связано с получением рекомбинантных продуцентов и основано на изучении свойств специфических ферментов структурной модификации стероидных соединений и идентификации кодирующих их генов.

В результате оценки активности более 400 штаммов мицелиальных грибов различных таксонов в отношении стероидов был выявлен штамм *Drechslera* sp. Ph F-34, эффективно осуществляющий 7α – и 7β гидроксилирование, а также 17β -восстановление карбонильной группы андростанов.

В настоящей работе изучена трансформация 3-оксо и 3-гидроксистероидов: андростендиона (АД), андростадиендиона (АДД), тестостерона (ТС) и дегидроэпиандростерона (ДГЭА) растущим и отмытым мицелием *Drechslera* sp. Ph F-34 в различных условиях индукции.

В качестве индукторов оценивались стероиды андростанового, прегнанового и холанового ряда. Ингибиторный анализ проводили с применением циклогексимида (ЦГ) и хлорамфеникола (ХФЛ). Стероиды анализировали методами ТСХ, ВЭЖХ, структуры идентифицировали с применением масс-спектрометрического, ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопического анализов.

Подтвержден конститутивный характер 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (17 β -ГСД) *Drechslera* sp., осуществляющей восстановление 17-кетогруппы АД, АДД и ДГЭА с образованием ТС, 1(2)-дегидротестостерона (ДГТС) и андростендиола, соответственно. Напротив, 7 α/β -гидроксилазная активность грибного мицелия индуцировалась стероидами. При этом, максимальный индуцирующий эффект выявлен для ДГЭА и снижался в ряду ДГЭА>прегненолон>листохолевая кислота, в то время как β -ситостерин не являлся индуктором синтеза стероидной 7-гидроксилазы. Ингибирующий эффект ЦГ и отсутствие влияния ХФЛ на синтез стероидной 7-гидроксилазы в клетках мицелия указывает на иную, чем митохондриальную природу монооксигеназы. На основе высокопроизводительного секвенирования мРНК мицелия, выращенного в условиях индукции ДГЭА и без индукции, среди дифференциально экспрессирующихся генов выявлены наиболее вероятные кандидатные гены (семейства цитохром P450), связанные с гидроксилированием стероидов в клетках мицелия *Drechslera* sp.

Результаты важны для идентификации гена новой грибной стероидной 7-гидроксилазы и открывают перспективы разработки способов селективного получения целевых 7-гидроксилированных и 17-восстановленных стероидов на основе ферментных систем грибных биокатализаторов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 21-64-0024).

ЗНАЧИМЫЕ ЮБИЛЕИ 2022 ГОДА В ИСТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ: 200-ЛЕТ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ Л. ПАСТЕРА И Л. С. ЦЕНКОВСКОГО

Н. Н. Колотилова

МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В грядущем 2022 году нас ожидают две памятные даты, значимые для истории микробиологии: 200 лет со дня рождения великого французского ученого, основателя научной микробиологии Луи Пастера (1822–1895) и 200 лет со дня рождения крупнейшего отечественного ученого в области изучения микроорганизмов, протистолога и бактериолога Льва Семеновича Ценковского (1822–1987). Оба юбиляра относятся к числу старейших ученых в области микробиологии. Их научные заслуги хорошо известны. С именем Пастера связаны фундаментальные открытия в химии, биологии и медицине: явление молекулярной диссимметрии; брожение и анаэробноз; доказательство невозможности самозарождения; победа над болезнями вина и эпизоотиями шелковичных червей; создание вакцины против сибирской язвы и разработка прививок против бешенства, ознаменовавшие зарождение иммунологии и вирусологии. Пастер является основателем экспериментального метода в медицине, реформатором высшего образования во Франции, создателем знаменитого Пастеровского института. Его столетие чрезвычайно широко отмечалось во Франции и в России.

Научные исследования Л. С. Ценковского, которого называли «русским Пастером», привели к постановке важнейшего вопроса об отсутствии границы между растительным и животным миром, к созданию отечественной сибиреязвенной вакцины, к решению ряда вопросов медицинской и промышленной микробиологии. Он был блестящим педагогом и создателем научных школ. Отмечалось ли столетие Л. С. Ценковского, неизвестно.

Данное обращение направлено на то, чтобы под эгидой Микробиологического общества продумать, подготовить и провести в 2022 году юбилейные мероприятия, связанные с именами обоих ученых.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ПРОТЕАЗЫ-АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ, ПРОДУЦИРУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D

Комаревцев С. К.^{1,2}, Осмоловский А. А.^{1,2}, Шабунин С. В.², Мирошников К. А.^{2,3}

¹Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, info@mail.bio.msu.ru

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, vnivipat@mail.ru

³Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, office@ibch.ru

Микромицет *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D является продуцентом фибринолитической протеазы, которая способна активировать протеин С плазмы крови – один из важных антикоагулянтных факторов, и поэтому может быть интересна в медицинской, диагностической и ветеринарной сферах применения. Ранее была установлена последовательность кДНК протеазы *A. ochraceus*, анализ которой свидетельствует о перспективности получения рекомбинантной формы фермента в бактериальной экспрессионной системе. Цель работы – получение рекомбинантной формы протеазы микромицета *A. ochraceus* в экспрессионной системе *E. coli* BL21, а также сравнение ее свойств с нативным ферментом из культуральной жидкости продуцента.

Свежетрансформированные экспрессионной плазмидой на основе вектора pET23d (Novagen) клетки *E. coli* BL21 засеивали в питательную среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина, выращивали до достижения оптической плотности при 600 нм $OD_{600} \approx 0.6$, после чего добавляли индуктор IPTG. Синтез белка проводили в течение 15 ч при 16°C. Полученную биомассу клеток гомогенизировали ультразвуком и проводили очистку протеазы при помощи нативной Ni-NTA хроматографии.

В результате работы была получена рекомбинантная форма протеазы микромицета *A. ochraceus*, установлена идентичность ее свойств с нативным ферментом из культуральной жидкости продуцента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер проекта 20-16-00085).

ПРОДУКЦИЯ НОВОГО АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ КУЛЬТУРОЙ *BACILLUS LICHENIFORMIS* И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Кондратьева Д. А., Капрельянц А. С., Демина Г. Р., Шлеева М. О.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, info@fbras.ru

Эффективность антибиотикотерапии туберкулеза, являющейся на сегодняшний день основным методом лечения заболевания, снижается за счет формирования и распространения резистентных к антибиотикам штаммов микобактерий, а также за счет способности патогена переходить в состояние покоя, в котором происходит остановка всех биохимических процессов, являющихся мишенями для современных антимикобактериальных препаратов. Для решения этой проблемы необходим поиск новых веществ, способных бороться с такими формами микобактерий. Недавно нами было обнаружено, что *Bacillus licheniformis* является антагонистом *Mycobacterium smegmatis*. В связи с этим целью данной работы являлось изучение способности *B. licheniformis* ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis*, а также характеристика антимикобактериального компонента, секретируемого клетками *B. licheniformis*.

Методы. Культуры *B. licheniformis* были выращены в богатой среде Nutrient Broth (Himedia, Индия) и в синтетической среде Миддлбрук 7Н9 (Himedia, Индия) в течение 1–2 суток

при 37 °С. Супернатанты (СН) этих культур были получены центрифугированием и были использованы для изучения свойств антимикробного соединения в отношении клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Оценка роста микобактерий в присутствии разных концентраций ингибирующего компонента проводили с помощью методов НВЧК и КОЕ. Для определения массы компонента были применены методы диализа и ультрафильтрации. Была определена устойчивость к повышенным температурам и действию протеиназы К. Антимикобактериальное действие супернатантов было оценено с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Супернатант, полученный из культур *B.licheniformis* полностью угнетает рост как *M. smegmatis*, так и *M. tuberculosis*. Микроскопические исследования выявили значительный лизис клеток микобактерий через сутки инкубации в присутствии СН. Антимикобактериальный компонент, содержащийся в СН теряет активность при нагревании свыше 80 °С; его масса менее 30 кДа, но больше 10 кДа; при разведении в 20 раз его ингибирующие свойства сохраняются; компонент не теряет активность под действием протеиназы К. По своим свойствам выявленное соединение отличается от антимикробных соединений, обнаруженных ранее в культурах *Bacillus licheniformis* (бацитрацин, лехиниформины, лихенионин, лихенин, BLC, AMP).

Выводы. *Bacillus licheniformis* секретирует ранее не изученное соединение, обладающее литической активностью в отношении *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium tuberculosis*. Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00324.

ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ, ЗАРАЖАЮЩИХ БАКТЕРИИ ГРУППЫ *BACILLUS CEREUS*

Копосова О. Н., Скорынина А. В., Шадрин А. М.

Лаборатория биологии вирусов бактерий, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, ФИЦ, Пушкино, galeolya@mail.ru

Введение и цель работы Группа *Bacillus cereus* — почвенные спорообразующие бактерии, которые часто контаминируют пищевые продукты. К этой группе бактерий относят также *Bacillus anthracis* — возбудителя сибирской язвы. Эндолизины — кодируемые бактериофагами ферменты, отвечающие за разрушение бактериальной клеточной стенки на финальной стадии литического цикла заражения бактерий бактериофагом. По этой причине эндолизины рассматриваются как перспективные антибактериальные средства, в первую очередь против бактериальных биопленок и бактерий с множественной антибиотикорезистентностью. Целью работы было определить характеристики пяти эндолизинов бактериофагов, выявленных в нашей лаборатории.

Материалы и методы В работе исследовались эндолизины Ply35 профага phIS3501, PlySam46 фага vB_BcM_Sam46, Ply57 фага Izhevsk, PlyB83 профага vB_BtS_B83, PlySam112 фага vB_BcM_Sam112. PlyG γ -фага использовался как референсный. Суперпродукция белка осуществлялась в системе *E.coli* BL21(DE3) pET33. Спектр антибактериальной активности определялся спот-тестом. Удельная ферментативная активность, термостабильность, чувствительность к уровню pH и концентрации NaCl определялись турбидиметрическим методом на штаммах *B.cereus* VKM В-370 и *B.cereus* ATCC 4342.

Результаты и обсуждение Доменные структуры эндолизинов были предсказаны в программе UniProt. Сравнение спектра специфичности действия эндолизинов на 35 штаммах *Bacillus* выявило сужение диапазона специфичности в ряду: Ply57 → Ply35 → PlyB83 → PlySam112 → PlySam46 → PlyG. Ply57 сохранял ферментативную активность при нагревании до 60 °С в течение 15 минут, PlyB83 — до 40 °С. Остальные эндолизины выдерживали нагревание до 50 °С. Ply57, PlyB83 и PlyG проявляли максимальную удельную ферментативную активность при pH 8,0, изменение уровня pH в диапазоне от 8,0 до 6,6 не вызывало значительного снижения активности этих эндолизинов. Ply35 и PlyB83 проявляли максимальную активность при низкой концентрации NaCl в фосфатном буфере, Ply57 — при 50 mM NaCl. Наиболее чувстви-

тельными к условиям среды оказались PlySam46 и PlySam1 12, их активность резко снижалась при pH более 6.0 и при внесении NaCl.

Выводы. В ходе работы были изучены характеристики всех представленных эндолизиннов. Они проявляют высокую удельную ферментативную активность в широком диапазоне условий.

ЧИСЛЕННОСТЬ КОПИЙ РИБОСОМАЛЬНЫХ ГЕНОВ И БИОМАССА МИКРООРГАНИЗМОВ БАРЕНЦЕВОМОРСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА

Корнейкова М. В.^{1,2,}, Никитин Д. А.³*

¹Российский университет дружбы народов, Москва,

²Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ РАН, Апатиты

³Почвенный институт им. В. В. Докучаева, Москва

**korneykova.maria@mail.ru*

Актуальность исследования полярных регионов постоянно возрастает в связи с быстрым и чутким откликом арктических экосистем на глобальное изменение климата. Кольский полуостров является субарктической частью Фенноскандии и Скандинавского полуострова, а также крайней материковой сушей северо-запада России, почти вся территория которого расположена за полярным кругом. Баренцевоморское побережье Кольского полуострова слабо изучено ввиду сложной логистической доступности. Исследования проводили в районе населенных пунктов Кола (68°53'07.3»N 33°02'22.6»E), Белокаменка (69°04'35.7»N 33°10'12.8»E), Печенга (69°34'38.6»N 31°13'58.5»E), Росляково (69°03'22.4»N 33°13'39.3»E), расположенных на баренцевоморском побережье Кольского полуострова. В песчаном грунте, отобранном в зоне литорали, и в прибрежной почве определяли содержание копий рибосомальных генов архей, бактерий и грибов методом ПЦР реал-тайм, а также запасы и структуру биомассы почвенных микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии – общую биомассу грибов и прокариот, длину и диаметр мицелия грибов и актиномицетов, долю мицелия в биомассе, численность спор и клеток прокариот, долю мелких и крупных грибных спорангий, морфологию спор микобиоты.

Наибольшее количество копий рибосомальных генов выявлено для бактерий (от $6,47 \times 10^9$ до $3,02 \times 10^{11}$ на г почвы). Численность копий рибосомальных генов грибов и архей изменялась в пределах 10^7 – 10^9 копий генов/г почвы. Биомасса микроорганизмов (прокариот и грибов суммарно) варьировала от 23 до 84 мкг/г почвы. Доля микобиоты в микробной биомассе составляла от 90 до 97 %. Численность прокариот не велика и колебалась от $1,87 \times 10^8$ до $1,40 \times 10^9$ клеток/г почвы, а биомасса грибов весьма существенна и изменялась от 0,021 до 0,715 мг/г почвы. Длина актиномицетного мицелия мала – от 0,77 до 88,18 м/г почвы, а грибных гиф – на порядок выше (до 504,22 м/г почвы). Доля грибного мицелия – активного компонента грибной биомассы – варьировала от 25 до 89 %. Большая часть (от 65 до 100 %) спорангий микобиоты представлено экземплярами мелких размеров в 2–3 мкм.

Таким образом, несмотря на крайнее положение на материковой суше Фенноскандии местные грунты имеют существенное количество микроорганизмов, от которых во многом зависит продуктивность экосистем.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАНТОВ ПО ГЕНАМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ ЛИМОННОЙ И ИЗОЛИМОННОЙ КИСЛОТ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Косихина Ю. М.^{1,*}, Таратынова М. О.¹, Юзбашева Е. Ю.²

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Москва

²БиоКаи Инк, 40471 Фримонт, Калифорния, США

*Juliya753@mail.ru

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются перспективным биотехнологическим продуцентом органических кислот. Так, при культивировании в условиях голодания по азоту природные изоляты *Y. lipolytica* секретирует смесь лимонной (ЛК) и изолимонной кислот (ИЛК), в условиях лимита по тиамину – пировиноградную и α -кетоглутаровую кислоты, были разработаны рекомбинантные штаммы, накапливающие янтарную кислоту. Транспорт органических кислот интермедиатов цикла Кребса в цитозоль через внутреннюю мембрану митохондрии осуществляют митохондриальные транспортеры.

Ранее мы выявили главные митохондриальные транспортеры цитрата и изоцитрата *Y. lipolytica* *YIYhm2p* и *YISfc1p*, соответственно.

Целью данной работы является изучение делеционных мутантов митохондриальных транспортеров лимонной и изолимонной кислот в дрожжах *Y. lipolytica*.

Нами была осуществлена инактивация гена кодирующего транспортер *YISfc1p* в диком штамме W29 и в рекомбинантном штамме W29($\Delta Ylyhm2$).

Были изучены фенотипические особенности штаммов W29($\Delta Ylyhm2$), W29($\Delta YIsfc1$) и W29($\Delta Ylyhm2\Delta YIsfc1$). Инактивация гена *YISFC1* привела к неспособности штаммов расти на минимальных средах с ацетатом и олеатом, а также к снижению роста на глюкозе и глицерине.

Культивирование рекомбинантных штаммов проводили в трех независимых повторностях в пробирках в среде с разными источниками углерода: глюкоза (9 %), глицерин (9 %) и с высоким молярным соотношением углерода к азоту.

Штаммы с инактивированным геном *YISFC1* характеризуются снижением продукции изолимонной кислоты в 4,7–10,1 раз, что подтверждает участие транспортера *YISfc1p* в экспорте изоцитрата. На среде с глюкозой, штамм W29($\Delta YIsfc1$) секретирует на 43 % меньше лимонной кислоты чем W29. Возможно, это объясняется ослабленным ростом W29($\Delta YIsfc1$) на среде с глюкозой. Примечательно, что в смеси органических кислот, накапливаемых штаммами с инактивированными митохондриальными транспортерами *YISfc1p* и *Ylyhm2p*, особенно при культивировании на глицерине, появляется α -кетоглутаровая кислота. Предполагается, что и цитрат, и изоцитрат выходят из митохондрии в обмен на цитозольный α -кетоглутарат. При инактивации генов *YIYHM2* и *YISFC1* α -кетоглутарат может секретироваться в среду культивирования. Помимо α -кетоглутаровой кислоты W29 ($\Delta YIsfc1 \Delta Ylyhm2$) на среде с глицерином накапливает значительное количество яблочной и пировиноградной кислот. Таким образом, инактивация генов митохондриальных транспортеров *YIYHM2* и *YISFC1* позволила переключить продукцию органических кислот дрожжами *Y. lipolytica* со смеси ЛК и ИЛК на α -кетоглутаровую, яблочную и пировиноградную кислоты.

СЕЗОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Кочаровская Ю. Н.^{1,2}, Делеган Я. А.², Соляникова И. П.^{2,3}

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, uch.secretar@pushgu.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, adm@ibpm.ru

³Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Info@bsu.edu.ru

Метагеномный анализ обычно применяют для исследования микробных сообществ, взятых непосредственно из окружающей среды. Таксономическая структура этих сообществ до конца не изучена, но выявлена ее зависимость от экологических факторов. Данные особенности могут послужить индикатором состояния экосистем. В работе проведен анализ зависимости структуры и состава сообществ от некоторых сезонных климатических изменений.

Были использованы образцы ила, отобранные из старицы вблизи реки Ока в районе г. Пушкино, отбирали образцы зимой и летом. Секвенирование проводили на Illumina MiSeq с использованием стандартных праймеров на V3-V4 регион 16S рРНК (341F и 806R). Обработка результатов осуществлялась с помощью пакета QIIME2. Таксономический анализ провели с использованием базы данных Greengenes. Число исследуемых прочтений составило 19252. При биннинге чистых и отфильтрованных прочтений мы получили 3024 ОТЕ с 97 % порогом сходства.

Отдел *Proteobacteria* доминирует в обоих образцах: его доля в сообществах составляет более 50 %, так как представители филума типичны для нарушенных местообитаний. Также в летнем сообществе наблюдалось доминирование *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, в зимнем – *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*. В летнем образце разнообразие микроорганизмов с доминированием семейств *Rhizobiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Lachnospiraceae* и *Enterobacteriaceae* меньше, чем в зимнем, в котором доминируют *Pseudomonadaceae*, *Solimonadaceae* и *Hyphomicrobiaceae*, но в обоих сообществах отмечается равное обилие видов. Выявлено, что в обоих образцах присутствуют микроорганизмы, участвующие в азотфиксации или денитрификации. В летнем сообществе найдены организмы, обитающие только в кишечнике млекопитающих, что указывает на загрязнение среды экскрементами, а в зимнем – микроорганизмы, которые способны осуществлять деструкцию химических загрязнителей. Оценка бета-разнообразия показала, что таксономический состав образцов различен, следовательно, в зависимости от времени года происходит изменение структуры сообщества в целом.

Таким образом, обнаружена зависимость структуры и состава сообществ от некоторых сезонных климатических изменений. Понимание этой зависимости в дальнейшем может помочь в определении состояния прибрежных экосистем как фактор, отражающий качество определенной экосистемы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № БРИКС 19-54-80003).

SHOTGUN-МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Кочаровская Ю. Н.^{1,2}, Делеган Я. А.², Минкина Т. М.³, Дудникова Т. С.³, Сушкова С. Н.³

¹Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, uch.secretar@pushgu.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН) – ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, adm@ibpm.ru

³Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону, rasic@sfedu.ru

Структура почвенных микробных сообществ и их таксономическое разнообразие в настоящее время изучены слабо. Особенности почвенного микробиома служат универсальным индикатором состояния почв. Цель данной работы – оценка таксономического разнообразия почвенных микробных сообществ.

Изучены четыре образца почв и грунтов Ростовской области: два из которых отобраны на самых загрязненных частях озера Атаманское (57 и 74), один (4) – на территории, подверженной максимальному воздействию со стороны Новочеркасской ГРЭС и один (Р) – контрольный из ООПТ «Персиановская степь».

Shotgun-секвенирование проводилось на NextSeq500 с помощью набора NEBNext Ultra II DNA library prep kit (NEB) по стандартному протоколу. Сборку геномов из прочтений и контроль качества сборок выполнен с использованием ПО SPAdes, BBDMap и MetaQUAST. Аннотация выполнена с помощью сервиса MG-RAST и сравнена с базами данных RefSeq, Silva, KEGG.

Выявлены доминирующие типы бактерий и архей. Среди бактерий доминируют типы *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Acidobacteria*. Первые два являются доминирующими во всех 4 образцах, *Firmicutes* и *Acidobacteria* в Р, 4, 57 и в 74, соответственно. Они являются типичными почвенными микроорганизмами. Доминирование актинобактерий связано с их повышенной устойчивостью к низкому содержанию влаги в среде, которое обусловлено длительным засушливым периодом на территории. *Proteobacteria* типичны для нарушенных местообитаний. Доминирование *Acidobacteria* в 74 образце связано с закисленными почвами, а вот *Firmicutes* наоборот предпочитают нейтральную и слабощелочную среду, поэтому и преобладают в трех других образцах. Среди архей доминируют – *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota*. Доминирование этих филумов связано с участием их представителей в почвенных круговоротах веществ. Выравненность обилия видов отмечается только в 57 и 74 образцах, а оценка бета-разнообразия указала на то, что сообщество 74 является наиболее уникальным из исследуемых.

Таким образом, изучена филогенетическая структура и разнообразие микроорганизмов в сообществах почв и грунтов Ростовской области. Полученные данные позволяют проанализировать зависимость биоразнообразия от внешних воздействий на почву, меняющих ее физико-химические характеристики.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 19-74-10046.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДГЕЗИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ РОДОКОККОВ

Криворучко А. В., Куюкина М. С., Ившина И. Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал
Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, nast@iegm.ru

Напряженная экологическая ситуация обуславливает необходимость расширения и интенсификации исследований особенностей микроорганизмов загрязненных сред, так называемых стресс-толерантов, играющих роль первичной системы реагирования на неблагоприятные или потенциально опасные изменения среды и инициирующие адаптивные реакции на самых ранних стадиях. Цель настоящей работы – исследование механизмов адгезии углеводородоокисляющих актиномицетов рода *Rhodococcus* (класс *Actinomycetia*) и оценка роли адгезии в формировании общей приспособляемости данной группы микроорганизмов к выживанию в условиях антропогенно загрязненных экосистем.

С использованием массива свежевыделенных и коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmcol.ru>) и комплекса микробиологических, физико-химических, биохимических, молекулярно-биологических и микроскопических методов исследования, включая атомно-силовую, конфокальную лазерную сканирующую и интерференционную микроскопии, обосновано, что адгезия является одним из основных механизмов, обеспечивающих биodeградацию углеводов, и универсальной

адаптивной реакцией родококков в ответ на повреждающее воздействие углеводов. Показано, что гликолипидные биосурфактанты, продуцируемые родококками в ответ на присутствие в среде жидких углеводов, выполняют функцию адгезивных молекул, установлена их важная роль в адгезии родококков. Выявлена прямая зависимость адгезивной активности родококков от степени шероховатости (особенности микрорельефа поверхности) клеток. Показана локализация адгезинов липидной природы в специфических придаточных структурах, обнаруживаемых на поверхности клеток, и их определяющая роль в адгезии *Rhodococcus*. С помощью метода высокочувствительной инфракрасной термографии исследована термодинамика адгезии родококков, обнаружен выраженный экзотермический эффект данного процесса и разработан простой, бесконтактный, экспрессный метод количественной оценки бактериальной адгезии. Получена серия работающих прототипов биокатализаторов на основе прикрепленных родококков, сохраняющих активность в течение 8 мес и пригодных для использования в процессах биодegradации углеводов и их производных.

Исследования выполнены в рамках госзаданий АААА-А19-119112290008-4, ААА-А-А19-119112290010-7, АААА-А19-119031890083-9 и при поддержке грантов РФФ 21-14-00132 и РФФИ 20-44-596001.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИОФАГА ϕ Vp-AMP1

Крупская М. Н.*, Богдан В. И., Иванов П. А., Летаров А. В.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, Москва

krupskayamary@gmail.com

*krupskayamary@gmail.com

Бактериофаги один из главных факторов регуляции численности и разнообразия бактериальных популяций. В частности, фаги *Burkholderia*, родственные фагу ϕ Vp-AMP1, предположительно, являются естественным механизмом контроля популяций возбудителей мелиоидоза *B. pseudomallei* в воде и в почве. Их важной чертой является наличие молекулярного сенсора, который практически полностью блокирует литический цикл при температуре среды меньше 25 °С. В связи с этим, исследование бактериофагов *B. pseudomallei* и механизмов их температурной чувствительности могут быть полезны для эпидемиологического прогнозирования мелиоидоза, а также для создания средств фаговой терапии и профилактики инфекции.

В работе использовались две линии фага ϕ Vp-AMP1: SPL1 (холодотолерантный мутант) и AMP1 (дикий тип). Ранее у холодотолерантного мутанта была выявлена делеция, захватывающая четыре открытых рамки считывания. Мы предположили, что в них присутствует ген, кодирующий репрессор, который ингибирует переход к литическому циклу.

В работе использовалась непатогенная бактерия *B. thailandensis*, родственная *B. pseudomallei* и имеющая сходные закономерности развития фагов ϕ Vp-AMP1. Для проведения эксперимента были получены и трансформированы методом химической в *B. thailandensis* рекомбинантные конструкции с предполагаемым репрессором, а также пустой вектор. Трансформированные бактерии выращивались на селективной среде. AMP1 и SPL1 раститровывались на полученных трансформантах и на исходных штаммах и инкубировались при температурах 37 °С и 24 °С с последующим сравнением эффективностей посевов фагов.

Было обнаружено, что присутствие предполагаемого «репрессора» увеличивает эффективность посева обоих фагов, что подтверждает его участие в температурной чувствительности, но говорит в пользу его антирепрессорного действия. Для полноценного понимания работы данного молекулярного сенсора также требуется исследование роли других генов, отсутствующих у холодотолерантного мутанта.

РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В АГРЕГАЦИИ *Dictyostelium discoideum*

Кручинин И. В.* , Яковенко Л. В.

МГУ им. М. В. Ломоносова, Физический факультет, Москва

*iv.kruchinin@physics.msu.ru

Введение

Dictyostelium discoideum (диктиостелиум) – клеточный слизевик (тип Mycetozoa), жизненный цикл которого содержит одноклеточную и многоклеточную стадии. Одиночные миксамебы обитают в почве и влажном листовом опаде в смешанных и широколиственных лесах умеренного пояса, питаются, в основном, бактериями, размножаются простым делением. При исчерпании ресурсов начинается агрегация одиночных клеток, в результате которой сначала образуются промежуточные кластеры клеток, а затем «многоклеточный» слизень, который уползает к светлomu, теплomu и сухому месту, где формирует плодовое тело, из которого рассеиваются споры.

На всех стадиях агрегации важнейшую роль играет циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), выделяемый клетками в окружающую среду и служащий хемоаттрактантом, вызывающим положительный таксис. Помимо цАМФ клетки синтезируют и выделяют фосфодиэстеразу (PDE), расщепляющую цАМФ, и ее ингибитор (PDI). Эти три вещества образуют так называемое «хемотаксическое поле», которое необходимо для ориентирования, хемотаксиса, ограничения роста агрегата, если это потребуется, и для межклеточной сигнализации [1].

Основная часть

Недавно установлено, что на направление движения клеток и промежуточных агрегатов оказывают влияние внутриклеточная концентрация ионов кальция. Кроме того, ионы Ca^{2+} влияют и на межклеточную адгезию. Нами впервые построена модель агрегации диктиостелиума с учетом роли ионов кальция на основе клеточного автомата, состоящего из конечных автоматов, моделирующих отдельные клетки. Клетки могут перемещаться по ячейкам клеточного автомата с учетом концентраций цАМФ и Ca^{2+} и наличия ближайших соседей.

Клетка или кластер клеток диктиостелиума меняют направление движения в зависимости от того, в каком направлении от клетки/кластера клеток находится максимум концентрации цАМФ. Причем менять направление на противоположное клетка/кластер не может. Также на выбираемое направление и на межклеточную адгезию влияют ионы Ca^{2+} . Как это происходит пока до конца не ясно, понятно только, что клетки диктиостелиума поглощают из среды ионы Ca^{2+} в ответ на стимуляцию цАМФ и чем больше Ca^{2+} в цитозоле, тем больше молекул, отвечающих за адгезию, появляется на внешней поверхности мембраны клетки [2].

Математически это выглядит так: если концентрация Ca^{2+} менее 40 нМ (рассчитывается по эмпирической формуле, подтвержденной экспериментальными данными [2]: $Ca_{c_i} = 10^{-8} * \ln(C_i) + 3.4 * 10^{-7}$, где Ca_{c_i} – концентрация ионов кальция, C_i – концентрация цАМФ во внеклеточном пространстве), то клетка с вероятностью 20 % движется в первоначально выбранном направлении (ориентация на локацию с максимальной концентрацией цАМФ); если концентрация $Ca^{2+} \geq 120$ нМ, то клетка с вероятностью 90 % движется в первоначально выбранном направлении; есть еще несколько промежуточных значений концентрации и вероятности. Результаты моделирования соответствуют экспериментальным данным.

КАТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛЛЮТАНТОВ

Крючкова Е. В.^{1,*}, Бурьгин Г. Л.¹, Гоголева Н. Е.², Гоголев Ю. В.², Турковская О. В.¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов,
mail@ibppm.ru

²Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ kibmail@kibb.knc.ru
*kryu-lena@yandex.ru

Актуальность: Хозяйственная деятельность человека приводит к деградации плодородных земель и загрязнению окружающей среды. Восстановление почвенного покрова с применением биопрепаратов на основе бактерий-деструкторов приобретает всё большее значение.

Цель: Для эффективного отбора бактерий-деструкторов поллютантов важно объединять традиционные культурально-биохимические методы с катаболической реконструкцией *in silico*.

Методы и результаты: С помощью методов сравнительного геномного анализа определены наличие, геномное окружение, предположительная функция некоторых ферментов, осуществлена попытка предсказания отдельных путей катаболизма ароматических и фосфорорганических соединений у ризосферных бактерий родов *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum*. Биоинформатические данные сопоставлены с результатами экспериментальных исследований.

Выводы: В большинстве случаев ароматические компоненты растений (различные производные бензойной и коричной кислот) являются субстратами катаболических оксигеназ азоспирилл. У близкородственных бактерий, имеющих структурно одинаковые *phn* опероны, может быть различный метаболический потенциал в отношении одних и тех же органофосфонатов, обусловленный разницей в аминокислотном составе белков.

Секвенирование, сборка и аннотация геномов поддержаны РНФ проект № 17-14-01363.

Биоинформатические исследования выполнены при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 18-29-05062.

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ И ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХСЯ ФОРМ БАКТЕРИЙ В ХОДЕ СУКЦЕССИИ В ПОЧВАХ АНТАРКТИДЫ (ОАЗИС БАНГЕРА)

Кудинова А. Г., Петрова М. А.

ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт»,
Москва, img@img.ras.ru

Одной из стратегий выживания бактерий является переход активных клеток в состояние покоя, которое зачастую характеризуется уменьшением размера клеток. Ранее в исследовании бактериальных сообществ антарктических почв было обнаружено, что половина или даже больше клеток представлена очень мелкими клетками, проходящими через фильтры с размерами пор 220 нм. Причем в антарктических почвах отмечено повышенное содержание таких фильтрующихся форм бактерий (ФФБ) по сравнению с почвами умеренных широт, но до сих пор остается открытым вопрос о разнообразии и физиологии таких клеток в этих экстремальных биотопах. Мы полагаем, что применение именно сукцессионного подхода в условиях, которые могут складываться в теплые периоды года в Антарктиде, позволит проследить динамику численности бактерий, а также более полно охарактеризовать таксономическое разнообразие всех бактерий, содержащихся в почве и их фильтрующихся форм.

Для постановки эксперимента были выбраны 3 образца почвы, в которых была выявлена значительная численность клеток ФФБ: образец криометаморфической почвы под содовой коркой и два образца из горизонтов АТ и АВ почвенного профиля из-под мохового по-

крова. Образцы почв увлажнялись до 30 %, а сукцессия проводилась при температурах 5 °С и 20 °С. Отбор и анализ проб проводили на нулевые, 4, 7, 14, 30, 60, 90 и 120 сутки. В работе использовались прямой люминесцентно-микроскопический метод с применением красителя акридина оранжевого и высокопроизводительное секвенирование участка гена 16S рРНК.

Динамика общей численности бактерий и динамика численности ФФБ по ходу сукцессии имели «пилообразный» характер. Причем, когда общая численность клеток обычного размера достигала максимума, для клеток из фракции ФФБ была зафиксирована минимальная численность, и наоборот. Исходя из данных по численности и содержанию клеток ФФБ в исследуемых образцах, можно предположить, что они вносят значительный вклад в стабильность бактериальных сообществ антарктических почв.

Результаты опытов с иницированием сукцессии показали, что таксономическая структура бактериальных сообществ исследованных антарктических почв стабильна при разных температурных режимах. Во фракции клеток обычного размера, по ходу сукцессии, не отмечено каких-либо значительных изменений таксономического разнообразия. Обнаружено, что фракции как клеток обычного размера, так и ФФБ представлены примерно одними и теми же филогенетическими группами. Возможно, что часть клеток микробного сообщества находится в покое состоянии и способна быстро переходить к активному росту при наступлении благоприятных условий и обратно – при неблагоприятных. Поэтому можно полагать, что ФФБ являются пулом клеток, который позволяет бактериям сохраняться 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.

РАСПОЗНАВАНИЕ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА БАКТЕРИОФАГОМ ф24В

Кузнецов А. С. (alexbluesking@gmail.com)^{1,2}, Ефимов А. Д.², Бойко К. М.³,
Голомидова А. К.², Куликов Е. Е.^{2,4}, Летаров А. В.^{1,2}

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

³Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

⁴Московский физико-технический институт, Москва

Введение

Некоторые штаммы бактерии *Escherichia coli*, населяющей кишечник млекопитающих, способны синтезировать опасные токсины. К таким штаммам относятся шигатоксигенные штаммы, или STEC, которые приобрели способность синтезировать шигаподобный токсин вследствие лизогенной конверсии Stx-фагами. Такие бактерии вызывают опасные токсикоинфекции у людей, являясь распространенной причиной диарей, геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома. Ген токсина *stx* экспрессируется только при индукции профага, и шигаподобный токсин высвобождается с лизисом клетки-хозяина. Одним из Stx-конвертирующих бактериофагов является объект данного исследования – ф24В. Этот вид отнесен к семейству *Podoviridae* (фаги с коротким несократимым хвостом). Как известно, необходимым событием в цикле вирусов является адсорбция вирусной частицы на поверхности клетки-мишени. Для ф24В были определены предположительные рецептор-распознающие белки grb1 и gr56, а также конечный рецептор фага – клеточный белок BamA. Несмотря на то, что Stx-фаги играют важную экологическую роль для микробиоты человека и животных, остаются невыясненными механизмы их адсорбции, являющейся первопричиной образования STEC. Цель данной работы – исследование факторов, влияющих на адсорбцию ф24В на поверхности клеток-хозяев.

Материалы и методы

В работе использовались методы молекулярного клонирования, экспрессии рекомбинантных белков, ультрацентрифугирования, сгуоЕМ, электрофореза ЛПС.

Результаты и обсуждение

В рамках исследования белка gp56 получили несколько делеционных вариантов экспрессионных конструкций и соответствующие рекомбинантные белки. Помимо белка gp56, потенциальным рецептор-распознающим белком ф24В является предположительный белок хвостовых шипов gp61. Биоинформатический поиск гомологичных гену *gp61* последовательностей выявил ген белка боковых фибрилл фага λ_{2B8} , любезно предоставленного Dr. M. A. Petit (институт Микалис, Франция). В связи с методическими сложностями работы с бактериофагом ф24В, в качестве модели для исследования влияния gp61 на процесс адсорбции был выбран бактериофаг λ_{2B8} , распознающий в качестве конечного рецептора белок LamB. Исходя из результатов экспериментов, предположили, что боковые фибриллы фага λ_{2B8} , как и белок gp61 фага ф24В не способны к специфическому взаимодействию с белком BamA. Для фага ф24В получили криоэлектронные микрофотографии вирионов и кривую адсорбции, подтвердили экранирующую функцию O-антигена в адсорбции этого бактериофага.

Выводы

Белок gp61 не способен к эффективному распознаванию конечного рецептора фага в процессе инфицирования клеток-хозяев. O-антигены исследованных штаммов бактерий подавляют адсорбцию ф24В, в то время как лизогены, полученные из таких штаммов, являются случайными rough-мутантами.

ЛИЗОГЕНИЗАЦИЯ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ К СЕРОТИПУ O157, STX-КОНВЕРТИРУЮЩИМ БАКТЕРИОФАГОМ PH124В СВЯЗАНА С ПОТЕРЕЙ O-АНТИГЕНА И СНИЖЕНИЕМ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ

Куликов Е. Е., Голомидова А. К., Ефимов А. Д., Кузнецов А. С., Летаров А. В.

ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, лаборатория вирусов микроорганизмов, Москва,
eumenius@gmail.com

Способность опасных для здоровья шигатоксигенных штаммов *E. coli* (STEC) продуцировать токсин зависит от лизогенного преобразования несущими ген токсина *stx*-бактериофагами. Канонический *stx*-фаг phi24В может лизогенизировать широкий спектр штаммов *E. coli*. In vivo вторичная лизогенизация симбиотических штаммов кишечной палочки *E. coli*, встречающихся в нормофлоре кишечника, фагами, высвобождаемыми инфицированными популяциями STEC, может вносить вклад в общую токсическую нагрузку на пациента и приводить к появлению новых патогенных штаммов STEC. В проведенном нами модельном эксперименте по лизогенизации природных изолятов кишечной палочки фагом 24В все полученные нами лизогены отличались нарушением биосинтеза O-антигена (Oag). Эти лизогенные штаммы приобрели чувствительность к T5-подобным бактериофагам и показали повышенную чувствительность к бактерицидной активности лошадиной сыворотки. Мы пришли к выводу, что в большинстве штаммов *E. coli* их естественный Oag эффективно ограничивает инфекцию клеток фагом phi24В. Лизогенные клоны преимущественно происходят от спонтанных мутантов с дефицитом синтеза Oag, и поэтому они имеют пониженную приспособленность к выживанию по сравнению с родительским штаммом, у которого Oag вырабатывается нормально. Можно сделать вывод, что такие обстоятельства не дадут несущим ген шигатоксина бактериофагам, родственным 24В, инфицировать значительную часть пула кишечной палочки микробиома кишечника in vivo.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АППАРАТ БАКТЕРИОФАГА В83 (vB_BtS_V83)

Кулябин В. А., Шадрин А. М.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, unicorn.vlad@gmail.com

Введение. Для координации принятия решения выбора пути лизиса-лизогении, умеренные бактериофаги, инфицирующие бактерии рода *Bacillus*, используют пептидную коммуникационную систему, называемую «арбитражем». Во время литической инфекции, зараженная клетка производит пептид, который проникает в другие клетки-хозяев. При высокой концентрации пептида предпочтение отдается в сторону выбора лизогенного пути. Управление экспрессии генов регулируется «системой арбитража», включающую в себя: AimR, AimP, AimX и С1. Детали механизмов индукции бактериофагов, опосредованных системой «арбитраж» в настоящее время мало изучены. Также остается открытым вопрос о саморегуляции транскрипционных факторов и влиянии сопутствующих белков на процесс организации внутри системы.

Цель. Исследовать транскрипционные факторы бактериофага В83.

Материалы и методы. Модельным объектом выступает бактериофаг В83 – хвостатый фаг, индуцированный митомицином С из штамма *B. thuringiensis* VKM В-83. Особенностью фага В83 является то, что в лизогенном состоянии он реплицируется в виде плазмиды. Интересующие гены были клонированы в плазмиду рЕТ33 и получены рекомбинантные белки в системе *E. coli* BL21(DE3) рЕТ33. Активность белков проверялась с помощью метода сдвига электрофоретической подвижности.

Результаты и обсуждения. Методом 5'-RACE установлены точки инициации транскрипции некоторых промоторов. Выявлены участки ДНК, с которыми взаимодействуют транскрипционные факторы системы арбитраж. Также, дана первичная характеристика Gr46 и Gr70 – транскрипционным факторам напрямую взаимодействующих с РНК-полимеразой.

Заключение. Таким образом, был проведен анализ ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов системы арбитража, а также их влияние на транскрипционную активность некоторых промоторов бактериофага. Полученные данные помогут глубже понять механизмы переключения лизис-лизогении бактериофагов и дополнить картину внутреннего взаимодействия транскрипционных факторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00300.

ОТБОР ШТАММОВ ГРИБОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ПУТЕМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДАХ

Кураков А. В.^{1,*}, Барков А. В.², Кулачкова С. А.¹, Шнырева А. В.¹, Кожевникова Е. Ю.², Кондратьева Е. Г.³, Терехова В. С.¹, Садыкова В. С.⁴

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, info@mail.bio.msu.ru

²Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина

³ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии, Институт биохимии им. А. Н. Баха

⁴ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

*kurakov57@mail.ru

Одним из актуальных направлений грибной трансформации органических отходов является получение на их основе кормов. Базидиомицеты – ведущие деструкторы органических субстратов и многие обладают питательными и лечебными свойствами.

Целью работы был поиск штаммов грибов-базидиомицетов для биоконверсии таких органических субстратов в кормовые добавки.

В качестве малоценных органических субстратов, отходов агропромышленных предприятий, были использованы пивную дробину, свекловичный жом, жмых подсолнечника,

пшеничные отруби, древесные опилки и пшеничную солому. Отбор штаммов разных таксонов проводили из коллекции кафедры микологии и альгологии, а также выделяли новые культуры из сборов плодовых тел в разных природно-климатических регионах. Идентификация грибов выполняли по рекомендуемым ключам, а большинство коллекционных штаммов и отобранные свежевыделенные изоляты определяли по молекулярно-генетическим признакам (секвенированием ITS рДНК). Первичный скрининг штаммов основывался на информации о питательных и лечебных свойствах разных видов, оценке целлюлазной и фенолоксидазной активности отобранных 57 штаммов, скорости роста на агаровых средах и субстратах отходов. Последующий отбор штаммов проводили по их оценке их антибиотической и гидролитической активностях, токсичности по тесту с инфузориями. По выделению CO₂ при твердофазном культивировании штаммов и обогащению органических отходов протеинами, жирами, улучшению перевариваемости оценивали степень их конверсии в корма. Отработали глубинную посевную культуру для твердофазного выращивания штаммов на отходах.

Создана рабочая коллекция из 163 штаммов – 95 свежевыделенных изолятов, из плодовых тел макромицетов, и 68 коллекционных штаммов. Она включала 96 видов 55 родов агарикомицетов, а также в неё вошло 10 ранее исследованных культур микроскопических грибов-аскомицетов. Первичный отбор по скорости роста и целлюлазной и фенолоксидазной активности культур-базидиомицетов на агаровых средах позволил отобрать 23 штамма родов *Laetiporus*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Flamulina*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Inonotus*, *Coprinus*, *Hypsizigus*. По наибольшей линейной скорости зарастания ими толщи изучаемых отходов выявлено перспективных 12 штаммов. Они не проявили токсических свойств к *Paramecium caudatum*, большинство обладали слабой и умеренной антибиотической активностью к *Candida albicans* ATCC 2091 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633, проявляли активность важных для кормов гидролитических ферментов – КМЦ-азы, ксиланазы, маннаназы, полигалактуроназы, фитазы, хитиназы, ламинариназы и амилазы. 5 штаммов родов *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Lentinula*, *Laetiporus*, *Coprinus* отобрано по высокой эффективности конверсии отходов (максимальной активности выделения CO₂ уже к 3 суткам твердофазного культивирования), максимальному повышению содержания белка, жиров, легкогидролизуемой клетчатки, перевариваемости в кормовых добавках. Планируются ряд химических анализов кормовых добавок и опыты по кормлению животных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-25073мк.

МИКОБИОТА ДОННЫХ ГРУНТОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Кураков А. В., Федорова М. Д.

Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, info@mail.bio.msu.ru
*kurakov57@mail.ru

Микобиота озер слабо изучена, нет даже данных о грибах в донных грунтах крупнейшего пресноводного о/ Байкал.

Целью работы было определение видового разнообразия грибов донных грунтов о. Байкал.

Образцы отбирали с глубин от 9 до 1200 м в 2019 и 2020 гг.. Выделение грибов проводили посевом мелкоземом на питательные среды из свежих образцов и после их непродолжительного хранения при +5 °С, инкубацию чашек в аэробных и анаэробных условиях при +7 °С. Грибы изолировали также со стерильных субстратов-приманок (опилки, целлюлоза, крахмал и агар-агар), инкубировавшихся в образцах грунтов. Штаммы идентифицировали по морфолого-культуральным признакам и молекулярно-генетически по ITS рДНК. Метагеномный анализ ДНК из грунтов провели методом NGS секвенирования по ITS1 и ITS2 участкам рДНК.

76 видов выделено из грунтов в аэробных посевах и 16 видов в анаэробных, 7 видов – только при анаэробной инкубации. Непосредственно с субстратов, на которых появился рост грибов, выделено 15 видов, из них 10 видов не было в посевах. Всего изолировали 93 вида из 49 родов 19 порядков 9 классов 4 отделов – Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota.

Метагеномный подход обнаружил значительно большее видов – 206 из 154 родов 50 порядков 21 класса 6 отделов – Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Chytridiomycota, Rozellomycota и Aphelidiomycota. Подавляющее большинство грибных ОТЕ не удалось идентифицировать до вида или рода, из Rozellomycota и Aphelidiomycota – ни одного. Всего 13 видов установлено обоими подходами.

В целом в донных грунтах о.Байкал выявлено 286 видов из 178 родов 52 порядков 22 классов 6 отделов. Многие из них обнаруживали в таких экотопах, но выявлены и виды, которые в донных грунтах озер не встречали. На основании представленности разных таксонов грибов в посевах и данных метагенома, их способности расти на разных субстратах в грунтах и физиологических свойствах выявлено около 20 видов вторично водных – преимущественно аскомицетов, базидиомицетные дрожжи и виды зооспоровых грибов, которые могут функционировать в донных отложениях Байкала.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЯЕМОЙ ПРИ МАСТИТЕ КОРОВ

Ладанова М. А.¹, Новикова О. Б.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины,
ldnvmr@mail.ru

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства –
филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Санкт-Петербург, ksuvet@mail.ru

Введение. Мастит у высокопродуктивных коров встречается довольно часто и наносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам во всём мире, оказывает негативное влияние на количество и качество молока. Одной из основных причин развития клинического и субклинического мастита у коров остается микробный фактор, особое значение в этиологии имеет условно-патогенная и патогенная микрофлора.

Материалы и методы. Нами было проведено бактериологическое исследование проб молока от коров с клиническими признаками воспаления молочной железы из четырёх животноводческих хозяйств разных районов Ленинградской области.

Результаты и обсуждение. При бактериологическом исследовании молока от коров, больных маститом, нами было выделено 57 культур разных видов микроорганизмов. При анализе выделенной микрофлоры установлено, что доминирующее место занимают стафилококки, удельный вес которых составляет 31,6 %. Из кокковой микрофлоры чаще всего выделяли следующие виды стафилококков: золотистый *Staphylococcus aureus*, лимонно-жёлтый *Staphylococcus citreus* и белый *Staphylococcus epidermidis*, из них около четверти – гемолитические. Для выявления вирулентных свойств выделенных стафилококков ставили реакцию плазмокоагуляции с плазмой кролика. Значительный процент выделения приходится на *Bacillus spp.*, удельный вес которых в спектре микрофлоры составил 29,8 %, в том числе половина обладающих выраженным гемолизом. В 14 % случаев были выделены культуры кишечной палочки *Escherichia coli*. Из семейства *Enterobacteriaceae* также были выделены культуры рода *Klebsiella spp.*, доля которых составила 12,2 %. В 5,3 % случаев были выделены стрептококки, в том числе гемолитические; а в 3,5 % случаев – культуры энтерококков, преимущественно видов *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*. Наименьший процент выделения – по 1,8 % – пришёлся синегнойную палочку *Pseudomonas aeruginosa* (возбудителя псевдомоноза) и сарцины *Sarcina spp.* С целью подбора эффективных средств лечения у доминирующих видов микроорганизмов была изучена чувствительность к антибактериальным препаратам разных групп (аминогликозиды, амфениколы, макролиды, полипептиды, тетрациклины, фторхинолоны, цефалоспорины и другие).

Заключение. По результатам проведенного исследования можно отметить насколько разным может быть микробный пейзаж при мастите у коров. Выявление доминирующей микрофлоры в каждом отдельном случае может отличаться, что зависит от эпизоотической ситуации в конкретном животноводческом хозяйстве. При бактериологическом исследовании молока как правило отмечается наличие смешанных инфекций. Для лучшего терапевтического ответа рекомендуется проводить микробиологическое исследование молока от боль-

ных маститом коров с обязательным определением чувствительности выделенных культур к антибактериальным препаратам. При использовании антибиотиков без определения чувствительности часто развивается антибактериальная резистентность у микроорганизмов. Перед началом проведения терапии необходимо выделить культуру, вызывающую воспаление молочной железы, а также определить чувствительность к антибактериальным препаратам и только после этого начинать лечение.

ЗАМЕНА β Q263L В АТФ-СИНТАЗЕ ДРОЖЖЕЙ ОСЛАБЛЯЕТ АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА И УЛУЧШАЕТ РОСТ КЛЕТОК БЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Лапашина А. С.^{1,2*}, Кашко Н. Д.^{1,2}, Зубарева В. М.^{1,2}, Галкина К. В.^{1,2}, Маркова О. В.¹,
Кнорре Д. А.^{1,2}, Фенюк Б. А.^{1,2}

¹НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

* lapashina@belozersky.msu.ru, +79191004873

АТФ-синтаза (F_0F_1) катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет протон-движущей силы на внутренней мембране митохондрий. При снижении этой силы (например, при гипоксии) фермент может работать в обратном направлении и АТФ-зависимо генерировать ее самостоятельно. АТФазная активность всех изученных F_0F_1 неконкурентно ингибируется комплексом MgАДФ (АДФ-ингибирование), однако свойства этого ингибирования неодинаковы у ферментов из разных организмов. Ранее мы показали, что у бактерий эти свойства в заметной степени определяются единичным аминокислотным остатком субъединицы β (β 249 у *Escherichia coli*, β 259 у *Bacillus subtilis*), и предположили, что остаток глутамина в этой позиции соответствует выраженному АДФ-ингибированию, а остаток лейцина – более слабому. Целью настоящей работы было распространить эту закономерность на митохондриальные F_0F_1 , которые в упомянутой позиции (у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* это β 263) содержат глутамин.

Мы получили штамм *S. cerevisiae* с заменой β Q263L в F_0F_1 -комплексе и сравнили свойства мутантного F_0F_1 с ферментом дикого типа на пермеабелизованных митохондриях и субмитохондриальных частицах. АТФазная активность образцов с мутацией хуже подавлялась АДФ и была менее чувствительна к азиду (блокирует АДФ-ингибированный фермент) и LDAO (препятствует АДФ-ингибированию и стимулирует гидролиз АТФ), т. е. замена β Q263L ослабила АДФ-ингибирование.

Скорость роста дрожжей с мутацией β Q263L была ниже, чем у родительского штамма. Однако в случае *rho0* дрожжей (без митохондриальной ДНК) штамм β Q263L рос быстрее, чем контрольный. Мы считаем, что клетки без мтДНК используют АТФазную активность F_1 в митохондриальном матриксе для поддержания протон-движущей силы на мембране за счет АТФ/АДФ-антипортера, и поэтому замена β Q263L, ослабляющая АДФ-ингибирование этой активности, оказывается для них полезной.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 20-14-00268).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ ГОРНЫХ ПОРОД, СОДЕРЖИМОГО ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ, ПОЕДАЕМЫХ ГРУНТЫ НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПОВЕДНИКОВ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Лебедева Е. Г.¹, Паничев А. М.², Рысева Ю. Ю.²

¹Дальневосточный геологический институт ДВО РАН, Владивосток, microbiol@mail.ru

²Тихоокеанский институт географии ДВО РАН, Владивосток

Геофагия – это феномен инстинктивного заглатывания грунтовых частиц, широко распространенный среди диких животных. Для этого они посещают определенные участки с характерными ландшафтными образованиями, обозначаемыми как «кудуры». По геологической природе такие биоминеральные образования кудуров, как правило, представлены глинистыми породами, в частности смектитами и цеолитами (Паничев 2012). Кудуры описывались для самых различных регионов мира, в Приморском крае кудуры находятся в Ольгинском, Тернейском и Пожарском районах. Наиболее типичные их посетители – травоядные млекопитающие, изюбрь (*Cervus elaphus*) и кабарга (*Moschus moschiferus*) (Паничев 2012; Plummer 2018). В литературе выдвигалось несколько предположений о значении микробиологического состава грунтов в явлении геофагии, однако этот вопрос остается до конца не раскрытым и мало исследованным во всем мире. В связи с этим целью исследования являлось изучить распространение, состав, численность физиологических групп и разнообразие микроорганизмов в горных породах и внутренних органах изюбря и кабарги, обитающих в заповедниках Приморского края.

Для проведения исследований в июле-сентябре 2020 г. были отобраны пробы горных пород и содержимого рубца и толстой кишки кабарги и изюбря, собранных в Тернейском и Ольгинском районах Приморского края. Отбор проб внутренностей животных производили с соблюдений строгой стерильности. Для выявления и культивирования бактерий использовали традиционные методы практической микробиологии. Анаэробные формы бактерий культивировали в анаэроостате с использованием газогенерирующих пакетов BD GasPak EZ. Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием молекулярно-генетических методов.

Результаты показали, что в горных породах присутствует довольно высокая численность бактерий, достигающая средних значений $4,4 \times 10^8$ КОЕ/гр. Среди физиологических групп особенно преобладали силикатные (до $1,2 \times 10^9$ КОЕ/гр), азотфиксирующие (до $9,2 \times 10^6$ КОЕ/гр), аммонифицирующие (до $8,4 \times 10^6$ КОЕ/гр) и осуществляющие гетеротрофную нитрификацию бактерии (до $2,2 \times 10^8$ КОЕ/гр). Данные группы микроорганизмов практически отсутствовали в содержимом рубца и кишки животных. Наибольшей численности в содержимом рубца и кишки животных достигали сапрофитные, амилотические, сахаролитические, молочнокислые микроорганизмы и энтеробактерии. В горных породах наиболее широко встречались дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*, а также микроорганизмы рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Acidovorax* sp., *Flavobacterium* sp., *Variovorax* и другие. В содержимом рубца и толстой кишки животных отмечено значительное преобладание различных видов *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia*.

Таким образом, полученные результаты показали высокую численность и широкое разнообразие микроорганизмов в грунтах и содержимом внутренностей животных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-67-47005.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У НОНСЕНС-МУТАНТОВ *SUP45* И *SUP35* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Леняшина М. О.¹, Максютенко Е. М.^{1,2}, Москаленко С. Е.^{1,2}, Барбитов Ю. А.¹,
Журавлева Г. А.¹

¹ Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет,

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

Введение. У дрожжей *S. cerevisiae* в процессе терминации трансляции участвуют два белковых фактора: eRF1 и eRF3. Эти белки кодируются жизненно важными генами *SUP45* и *SUP35*, соответственно. Ранее в нашей лаборатории были получены жизнеспособные нонсенс-мутанты *sup45* и *sup35*, механизмом выживания которых, вероятно, является увеличение количества копий мутантных аллелей этих генов. Известно, что нарушение терминации трансляции приводит к различным плейотропным эффектам, в частности, дыхательной некомпетентности. В данной работе оценивали уровень митохондриальной ДНК (мтДНК) у нонсенс-мутантов по генам *SUP45* и *SUP35* по сравнению со штаммами дикого типа.

Материалы и методы. В нашей работе мы провели эксперименты по оценке копийности гена *COX3*, находящегося в мтДНК у мутантов *sup45* и *sup35* по сравнению со штаммами дикого типа. Для этого, на основе штаммов U-14-D1690 [*sup35ΔpRS316-SUP35*] и U-1A-D1628 [*sup45ΔpRS316-SUP45*], методом плазмидного шаффлинга были получены штаммы, содержащие плазмиды с мутантными аллелями генов *SUP35* и *SUP45*. Далее была выделена геномная ДНК из штаммов с аллелями дикого типа и мутантными аллелями и проведена серия количественных ПЦР в реальном времени для сравнения количества копий мтДНК.

Результаты. На основе полученных данных было обнаружено увеличение копийности митохондриального гена *COX3* в штаммах, содержащих плазмиды с нонсенс-мутантными аллелями генов *SUP35* и *SUP45*. Мы проанализировали корреляцию между результатами, полученными при оценке копийности центромерных плазмид и мтДНК в изучаемых штаммах. Статистический анализ показал высокую степень корреляции между изменениями числа копий плазмиды и мтДНК у разных мутантов *sup35* и *sup45*.

Заключение. Полученные результаты позволили выявить изменения в количестве мтДНК у мутантов *sup45* и *sup35*, что, вероятно, связано с адаптацией дрожжей к нарушению процесса терминации трансляции.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00050 и выполнена в рамках гостемы №0112-2016-0015.

ПЕРЕВИВАЕМЫЕ АССОЦИАЦИИ БАКТЕРИОФАГА *phKp2* И *KLEBSIELLA PNEUMONIA*.

Летарова М. А. *, Меньшикова Т. М., Фрумкина С. К. Марулева А. А. Летаров А. В.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского ФИЦ «Биотехнологии» РАН

*letarova.maria@gmail.com

Вирулентные бактериофаги в высокоплотных бактериальных сообществах способны, находясь рядом со штаммом-хозяином достаточно длительное время поддерживаться в высоком титре, при этом сохраняя популяцию штамма-хозяина. Мы выделили бактериофаг клебсиелл *phKp2*, который является вирулентным для трех различных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (ABK big, ABK small и штамм D) и образует с ними перевиваемые ассоциации, содержащие как фаг. В этих ассоциациях обнаруживаются как чувствительные, так и резистентные субклоны штамма-хозяина на протяжении по крайней мере пятнадцати пассажей.

Штаммы *Klebsiella pneumoniae* выделили из природных биопленок и типировали методом IS-PCR, бактериофаг *phKp2* выделили из препарата «Поливалентный бактериофаг», производства ЗАО «Микроген», геном сиквенировали. Бактериофаг *phKp2* рассеяли до отдельных бляшек на каждом штамме-хозяине, из шестнадцати бляшек с каждого штамма стерильной зубочисткой перенесли содержимое на чашку с плотным агаром LB. Культивировали при 37 °C в течение 18 ч., полученные псевдолизогенные ассоциации (ПА) пассировали на твердой среде.

ПА тестировали на способность лизировать газон исходного штамма, в нескольких поколениях посчитали содержание бактериофага в пересчете на одну клетку, исследовали удельно содержание инфекционных центров в различных поколениях ПА и оценили появление резистентных к фагу *phKp2* субклонов штаммов-хозяев. Для некоторых чувствительных и резистентных субклонов ПА их различных поколений мы выделили экспресс-методом О-антигены и провели электрофорез в акриламидном геле.

Все выделенные штаммы *Klebsiella pneumoniae* образуют устойчивые перевиваемые ПА с фагом *phKp2* от пятнадцати до двадцати поколений.

ПА разных штаммов-хозяев различаются по содержанию бактериофага, по чувствительности субклонов ПА по исходному бактериофагу, по скорости появления субклонов, устойчивых к бактериофагу при пересевах ПА.

Паттерны О-антигенов устойчивых к фагу субклонов и чувствительных различаются у всех штаммов. Паттерны чувствительных субклонов у всех штаммов совпадают с таковыми у исходной культуры, от которой произошли ПА.

Во всех ПА образуются мутанты бактериофага, не образующим бляшки на газоне исходного фага, но образующим бляшки на газонах субклонов ПА. Паттерны О-антигена этих субклонов соответствовали их отношению к исходному фагу.

Таким образом, полученные нами системы представляют собой метастабильные коэволюционирующие ассоциации, в которых, не смотря на высокую плотность фаговых и бактериальных популяций, вирулентный бактериофаг поддерживается в течение значительного числа генераций (один пассаж соответствует примерно 7-10 генерациям бактерий). Перевиваемые на плотных средах ПА могут служить экспериментальной моделью для исследования феномена длительного сосуществования фагов и бактерий в природных высокоплотных экосистемах.

СПОСОБЫ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ВИРУСНОЙ РЕПРОДУКЦИИ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИИ

Липскеров Ф. А.^{1,*}, Ершова Н. М.², Шешукова Е. В.², Комарова Т. В.^{1,2}

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

*fedor@lipskerov.ru

Многие рекомбинантные терапевтические белки производятся как в культуре бактериальных клеток, так и клеток млекопитающих и дрожжей. Однако вопрос поиска и оптимизации альтернативных систем экспрессии по-прежнему актуален. Одной из подобных платформ продукции является растительная система, в которой, используя агробιοтехнологические подходы, за несколько дней можно накопить большое количество целевого белка. Целью исследования является разработка методов стимуляции вирусной репродукции в растении *Nicotiana benthamiana* для повышения выхода целевых белков.

Подход, используемый в работе, основан на доставке агробактерией в растительные клетки экспрессионного вектора, созданного на основе генома вируса табачной мозаики крВТМ), в котором ген белка оболочки заменен на целевой ген.

Ранее нами было обнаружено, что при нарушении ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке, вызванном суперпродукцией коротких некодирующих РНК, экспортируемых из ядра, создаются условия, благоприятные для репродукции цитоплазматического РНК-содержащего вируса^[1]. Мы предположили, что высокий уровень синтеза чужеродного белка, содержащего сигнал ядерной локализации (NLS), будет также интерферировать с ядерно-цитоплазматическим транспортом, что приведет к повышению эффективности репродукции вирусного вектора, а, соответственно, и синтеза целевого белка. Для проверки этого предположения в качестве искусственного ядерного белка использовали RFP, слитый с NLS. При совместной агротрансформации клеток *N. benthamiana* конструкциями крВТМ:GFP и 35S-RFP:NLS наблюдалось 5-кратное повышение эффективности продукции GFP по результатам измерения флуоресценции в растительных экстрактах. В качестве целевого рекомбинантного белка мы использовали моноклональное антитело, сборка которого происходила в растительной клетке, трансформированной вирусными векторами, кодирующими тяжелую и легкую цепь антитела трастузумаб. Мы показали, что уровень накопления собранного антитела в растении был в 2 раза выше при использовании RFP:NLS в качестве стимулятора вирусной репродукции по сравнению с контролем (RFP). Таким образом, искусственные NLS-содержащие белки могут применяться как биотехнологический инструмент для повышения продукции целевого белка, направляемой вирусным вектором, в системе транзиторной экспрессии в растении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-74-20031.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ РОТОРНЫХ АТФ-СИНТАЗ

Литвин А. В.¹*, Шошинова М. С.¹, Лапашина А. С.^{1,2}, Фенюк Б. А.^{1,2}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

² НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991 Москва

* litvinannaemail@gmail.com, +79253568887

Роторные АТФ-синтазы и АТФазы сопрягают реакцию синтеза или гидролиза АТФ с трансмембранным переносом H^+ или Na^+ . Ферменты F, N и A типа присутствуют практически во всех бактериальных и архейных геномах. Фермент может использовать протонный и натриевый мембранный градиент для синтеза АТФ или создавать градиент за счет гидролиза АТФ. Ионная специфичность АТФ-синтазы обусловлена ее мембранной частью, которая состоит из с-кольца и субъединицы *a*. Известны аминокислотные позиции в субъединице *s*, которые необходимы и достаточны для специфического переноса иона натрия *in vitro*. Однако *in vivo* перенос иона также связан с субъединицей *a*, роль которой в натриевой специфичности не известна. Использование именно натриевого градиента считается эволюционно первичным, однако редко для современных микроорганизмов.

Целью данной работы было изучение распространенности натриевой биоэнергетики среди микроорганизмов на примере репрезентативной базы геномов прокариот, которая использована в базе данных COG, а также изучение особенностей субъединицы *a* натриевых ферментов. В геномах 83 архей и 628 бактерий были найдены и проверены гены АТФ-синтаз, скомбинированы опероны и целые ферменты, определена ионная специфичность.

Анализ БД COG показал, что у всех архей есть АТФ-синтазы А-типа. При этом бактерии могут иметь АТФ-синтазу как F, так и А-типа, а также комбинации нескольких ферментов, включая фермент N-типа. В соответствии с литературой, было обнаружено, что фермент N-типа встречается в геномах только как вторая, дополнительная АТФаза, и скорее всего распространяется горизонтальным переносом генов и выполняет роль АТФ-зависимого ионного переносчика. Часто фермент N-типа оказывается натриевым, при этом основная АТФ-синтаза микроорганизма протонная — такие комбинации филогенетически широко распространены. Бактерии с истинной натриевой биоэнергетикой, которые имеют только натрий-транслоцирующую роторную АТФазу F-типа, обнаруживаются в таксонах Firmicutes, Tenericutes, Fusobacteria, Thermotogae и являются анаэробами.

Корреляционный анализ аминокислот в последовательностях показал наличие нескольких позиций в субъединице *a*, специфических для натриевых ферментов.

Таким образом, данная работа уточняет распространенность натриевых АТФ-синтаз среди прокариот, а также выявляет роль субъединицы *a* в ионной специфичности АТФ-синтаз F-типа.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ (проект 21-14-00242).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ САХАРОЛИТИЧЕСКИХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АЭРОБОВ ИЗ ПОДЗЕМНЫХ ГЛУБИННЫХ ГОРИЗОНТОВ ЗАПАДНО-СИБИРСКОГО АРТЕЗИАНСКОГО БАССЕЙНА

Лукина А. П.* , Панова И. А., Карначук О. В

Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, Томск

*anastasiya-lukina-93@mail.ru

Глубинные термальные водоносные горизонты являются источником новых прокариот и новых ферментов. Большинство исследований микроорганизмов подземной биосферы базируется на представлении о ее анаэробном характере. Многие классические исследования представляют глубинные сообщества как микроорганизмов, растущих в темноте без доступа кислорода. Однако в наших исследованиях газового состава подземных вод мы часто обна-

руживаем кислород, который до сих пор рассматривали как артефакт измерений. Несмотря на возможность физиологической характеристики микроорганизмов путем сборки геномов из метагеномной ДНК, минуя культивирование, однозначное определение возможности роста в аэробных условиях затруднительно без этапа культивирования. Настоящее исследование представляет попытки культивирования сахаролитических микроорганизмов подземной биосферы способных расти в присутствии кислорода воздуха.

В качестве инокулята использовали микробные обрастания, развивающиеся на устье глубоких термальных скважин в поселке Винокурова Тюменской области и поселке Чажемто Томской области. Получено несколько чистых культур аэробов, растущих на сахарах. Штамм, обозначенный 1095, аэробно рос на среде DSM641 при температуре 50 °С с использованием сахарозы в качестве единственного органического субстрата. Ближайшим родственником бактерии со сходством последовательностей 97,9 % является *Thermococcus aegyptius*, выделенный из окисленных почв Египта. Штамм, обозначенный 1097, аэробно рос на среде Видделя-Бака при температуре 50 °С на смеси крахмала и глюкозы. Бактерия относится к роду *Paenibacillus* и ее ближайшим родственником (98,8 %) является *P. phoenicis*, устойчивый к высоким дозам УФ-излучения и выделенный из чистой комнаты по сборке марсохода Phoenix Mars Lander. Оба штамма были выделены из скважины в Тюменской области. Из скважины 5-Р в поселке Чажемто выделен штамм 1040, растущий при температуре 50 °С на среде с Видделя-Бака с крахмалом. Ближайшим родственником штамма является «термоактиномицет» *Planifilum fimeticola* (97,7 %), выделенный из компоста в Японии.

Парадоксально, культивирование на чашках Петри в аэробных условиях привело также к выделению термофилов, ранее считавшихся анаэробами. Термофильный характер роста всех штаммов является косвенным подтверждением их происхождения из глубоких термальных горизонтов.

Исследование поддержано Стипендией Президента РФ для молодых ученых в 2021-2023 гг. (СП-3706.2021.1).

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ И ИХ ВЛАДЕЛЬЦЕВ

Лыков И. Н.¹, Галемина И. Е.², Зайцева Н. С.², Капинус Я. А.

¹Институт естествознания и Медицинского института Калужского государственного университета им. К. Э. Циолковского, Калуга, linprof47@yandex.ru,

²Калужский государственный университет им. К. Э. Циолковского, Калуга,

Животные, которые содержатся в домашних условиях, колонизированы широким спектром микроорганизмов, формирующих их микробиом [1]. Микробиом животного создает барьер для защиты от потенциальных патогенов, влияет на иммунную систему и обеспечивает хорошее состояние всего организма [2]. Тесный контакт между домашними животными и людьми создает благоприятные условия для обмена микроорганизмами через прямой или косвенный контакт. Исследования микробиома человека и животных показали, что окружающая среда и присутствие животных в доме изменяют всю домашнюю микробиоту. Жилища с собаками и кошками имеют большее бактериальное разнообразие, которое формируется, в том числе, из бактерий, обитающих на коже и шерсти животных. Поэтому контакт с животными, совместное проживание с ними, имеет значительное влияние на разнообразие и состав микробиома человека [3]. По различным оценкам на каждом квадратном сантиметре кожи собак и кошек обитает от 350 до миллиона различных микроорганизмов, которые активно распространяются внутри помещения и принимают участие в формировании микробиома человека. Поэтому домашние животные и их хозяева имеют общие бактериальные популяции, их сообщества микроорганизмов становятся более похожими друг на друга [4].

В последнее время все больше внимания уделяется проблеме устойчивости к антибиотикам бактерий домашних животных, которые находятся в тесном контакте с людьми. Такие животные могут делиться устойчивыми бактериями со своими владельцами, а последние передавать аналогичные бактерии своим питомцам [5, 6].

Устойчивость к противомикробным препаратам является серьезной проблемой во всем мире. Антибиотики – одно из наиболее часто используемых лекарств у людей и животных. Интенсивное использование противомикробных средств является одним из основных факторов образования устойчивых бактерий. Даже очень низкие концентрации противомикробных препаратов могут привести появлению резистентных бактерий, которые в дальнейшем активно перемещают мобильные генетические элементы. Инфекции, вызванные резистентными организмами, появление патогенных и непатогенных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, представляет собой глобальную проблему, поскольку увеличивает заболеваемость, смертность и снижает эффективность лечения инфекционных заболеваний [7, 8]

Модели и методы. Объектами исследования были кошки (от 2 до 10 лет; n = 35), собаки (от 2 до 10 лет; n = 35), владельцы домашних животных (n = 20), корм для животных (n = 10). Смывы брали стерильными зондами-тампонами с поверхности спины и живота животных, с кожи ладонной части предплечья владельцев. Количественный учет микроорганизмов (колонии образующие единицы – КОЕ) проводили в соответствии с Методическими указаниями МУК 4.2.2942-11. Идентификацию бактерий выполняли в следующей последовательности: описание культуральных признаков выделенного микроорганизма; получение чистой суточной культуры путем посева на питательные среды; окраска по Граму и микроскопирование препарата. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам осуществляли диффузионным методом с использованием дисков, пропитанных антибиотиками (табл. 1).

Таблица 1

Перечень использованных антибиотиков

№ п/п	Наименование	Концентрация	Обозначение
1	Офлоксацин	5 мкг	ОФ
2	Кларитромицин	15 мкг	КТМ
3	Бензилпенициллин	10 ед.	ПЕН
4	Ципрофлоксацин	5 мкг	ЦИП
5	Новобиоцин	5 мкг	НБ
6	Доксициклин	30 мкг	ДОК
7	Левифлоксацин	5 мкг	ЛФЦ
8	Фосфомицин	200 мкг	ФОС
9	Тобрамицин	10 мкг	ТОБ
10	Оптохин	6 мкг	ОП
11	Тетрациклин	30 мкг	ТЕТР
12	Ампициллин	10 мкг	АМР

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что существует различие в количестве микроорганизмов, выделенных из образцов кожи и шерсти собак и кошек. У собак общее количество микроорганизмов (610 ± 148 КОЕ/см²) было статистически выше, чем у кошек (380 ± 97 КОЕ/см²). У хозяев общее количество микроорганизмов кожи составило 120 ± 49 КОЕ/см².

Микробиота кожи жителей, имеющих домашних собак и кошек, имеет схожий с ними пейзаж, что свидетельствует об обмене микроорганизмами. Чаще всего на поверхности кожи у животных и у их владельцев обнаруживались бактерии и кокки. Реже у кошек и их хозяев высевали энтеробактерии и бактерии группы кишечной палочки. Количество энтеробактерий и кишечных палочек, выделенных от собак, было больше (рис. 1).

Выделенные микроорганизмы в той или иной степени обладали мультирезистентностью к исследованным антибиотикам. Уровень устойчивости изолятов к антибиотикам варьировал у кошек от 2,7 % до 91,3 %, у собак – от 3,0 % до 64,7 %, у владельцев животных – от 4,9 % до 50 % (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, обмениваясь микрофлорой в процессе общения, животные и человек обмениваются и устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами. Между человеком, животными и окружающей средой существует множество связей, которые позволяют перемещаться не только бактериям, но и мобильным генетическим элементам. Поэтому существует высокая вероятность передачи множественной лекарственной устойчивости от человека к животным и наоборот.

Наибольшую устойчивость выделенные микроорганизмы проявляли в отношении тобрамицина (от 57,4 % до 91,3 %), ампициллина (от 40,9 % до 58,3 %), ципрофлоксаци-

на (от 50,0 % до 69,7 %), офлоксацин (от 45,4 % до 73,9 %), доксицилин (от 59,1 % до 69,7 %). Изоляты бактерий кишечной группы, энтеробактерий, а также стафилококка и стрептококка показали наибольшую антибиотико-резистентность (рис. 3).

Распространению антибиотикоустойчивых микроорганизмов в некоторой степени способствуют и корма для животных. Результаты наших исследования показывают, что в кормах содержатся микроорганизмы устойчивые к бензилпенициллину (60 %), новобиоцину (60 %), кларитромицину (40 %), фосфомицину (40 %) и ампициллину (30 %). Эти антибиотики обладают широким спектром действия, что провоцирует проявление мультирезистентности.

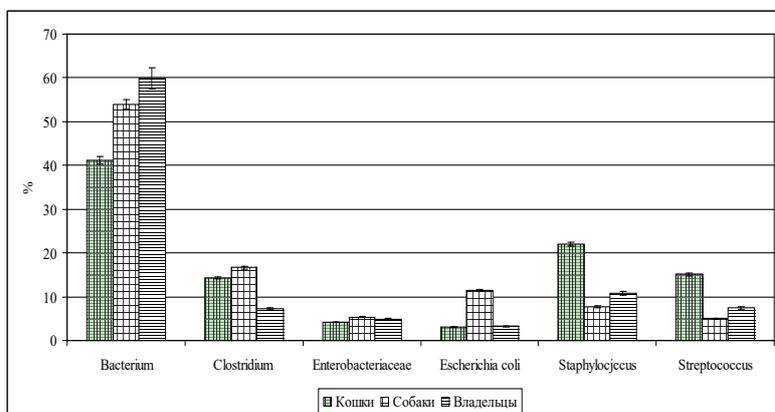


Рис. 1. Микроорганизмы кожи кошек, собак и их хозяев

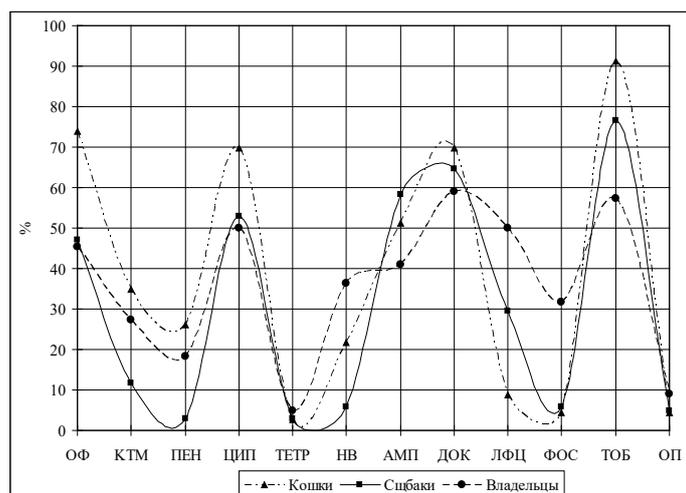


Рис. 2. Совокупная устойчивость к антибиотикам выделенных микроорганизмов

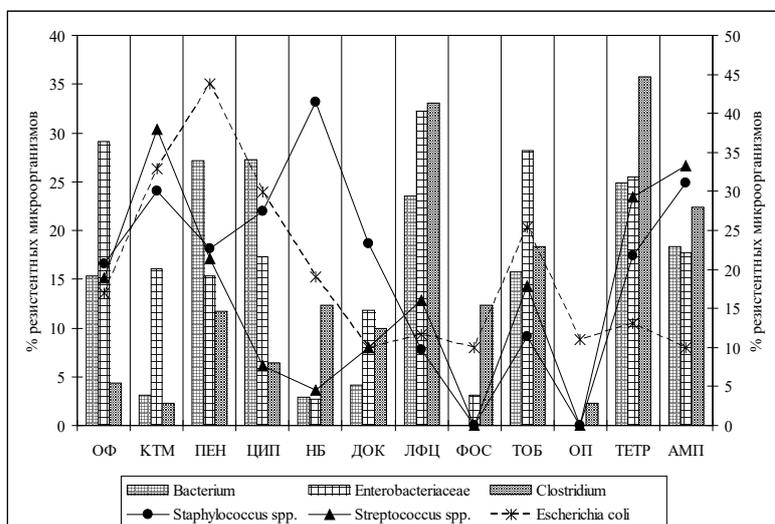


Рис. 3. Дифференциальная антибиотико-резистентность выделенных бактерий

Закключение

1. Выявлено различие в количестве микроорганизмов, выделенных из образцов кожи и шерсти собак и кошек. У собак общее количество микроорганизмов (610 ± 148 КОЕ/см²) было статистически выше, чем у кошек (380 ± 97 КОЕ/см²). У хозяев общее количество микроорганизмов кожи составило 120 ± 49 КОЕ/см².

2. Микробиота кожи жителей, имеющих домашних собак и кошек, имеет схожий с ними пейзаж.

3. Уровень устойчивости изолятов к антибиотикам варьировал у кошек от 2,7 % до 91,3 %, у собак – от 3,0 % до 64,7 %, у владельцев животных – от 4,9 % до 50 %.

4. Наибольшую устойчивость микроорганизмы проявляли в отношении тобрамицина, ампициллина, ципрофлоксацина, офлоксацина, доксициллина.

5. В кормах для собак и кошек содержатся микроорганизмы, устойчивые к бензилпенициллину (60 %), новобиоцину (60 %), кларитромицину (40 %), фосфомицину (40 %) и ампициллину (30 %).

РОЛЬ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS ПРИ ОБРАЗОВАНИИ БИОПЛЕНК И АДАПТАЦИИ К СТРЕССАМ У ПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ CLOSTRIDIODES DIFFICILE

Майкова А. С.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, office@spbstu.ru
ann-maikova@yandex.ru

Clostridioides difficile – анаэробная, грамположительная, спорообразующая бактерия, которая является одной из самых распространенных патогенных клостридий. *C. difficile* вызывает внутрибольничные кишечные инфекции, связанные с применением антибиотиков, во всем мире. Однако многие аспекты патогенеза *C. difficile* до сих пор остаются малоизученными. Недавно у *C. difficile* было обнаружено присутствие активной системы CRISPR-Cas, обеспечивающей противофаговую защиту данной бактерии. *C. difficile* обладает довольно нестандартной CRISPR-Cas системой, которая состоит из множественных активно экспрессирующихся CRISPR-кассет, часть из которых находится в профагах, и нескольких наборов cas генов подтипа I-B. Такое сложное строение данной системы у *C. difficile* ставит вопрос об ее возможной роли в вирулентности и других аспектах физиологии данной бактерии. Целью презентируемой работы является изучение роли системы CRISPR-Cas *C. difficile* в инфекционном цикле и физиологии данного патогена, прежде всего при образовании биопленок и в ответах на стрессы.

Для анализа экспрессии компонентов системы CRISPR-Cas *C. difficile* в различных условиях роста был использован метод количественной ПЦР в реальном времени. Дополнительно для анализа эффективности CRISPR-интерференции в различных условиях роста был применен метод подсчета эффективности конъюгации плазмид.

В ходе выполнения экспериментов была показана индукция экспрессии cas оперонов и всех CRISPR кассет и увеличение уровней интерференции у части CRISPR кассет при высоких внутриклеточных уровнях циклического ди-гуанозинмонофосфата, который является важным фактором образования биопленок у бактерий. Также в работе было выявлено, что в присутствии дезоксихолата натрия в питательной среде, который является стрессовым фактором для *C. difficile*, происходит увеличение уровней экспрессии одного cas оперона и части CRISPR кассет и снижение эффективности интерференции в большинстве CRISPR кассет.

Полученные результаты демонстрируют регуляцию системы CRISPR-Cas *C. difficile* в условиях образования биопленок, а также в ответе на стрессовые факторы. Это может свидетельствовать о важной роли данной системы в адаптации *C. difficile* к неблагоприятным факторам среды.

Работа была поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-667.2021.1.4.

ВЛИЯНИЕ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

Максимова Ю. Г.^{1,2,*}, Быкова Я. Е.^{1,2}, Зорина А. С.¹, Максимов А. Ю.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
илиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН

²Пермский государственный национальный исследовательский университет

*yul_max@mail.ru

Введение. По представлениям современной микробиологии основной формой существования микроорганизмов в природе является адгезированное состояние и формирование многовидовых сообществ, погруженных в вырабатываемый ими полимерный матрикс. Биопленкообразование является важным процессом, на котором основаны очистка сточных вод, биотехнологическое получение энергии и ряд промышленных процессов. Углеродные нанотрубки, являясь относительно новым материалом с уникальными свойствами, находят широкое распространение в различных отраслях промышленности, неизбежно попадают в стоки и окружающую среду, в связи с чем актуально изучение их воздействия на биопленки микроорганизмов. **Целью работы** явилась оценка влияния многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ) на биопленки бактерий родов *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus* – распространенных представителей окружающей среды.

Материалы и методы. Массивность биопленок оценивали по окраске кристаллическим фиолетовым, дыхательную активность по изменению окраски реагента ХТТ (восстановление соли тетразолия до формазана), жизнеспособность клеток биопленки методом эпифлуоресцентной микроскопии (окраска LIVE/DEAD®).

Результаты и обсуждение. Показано, что МУНТ не ингибировали биопленкообразование всех изученных бактерий. Карбоксилированные и олеофильные МУНТ приводили к формированию достоверно более массивной биопленки грамотрицательных бактерий родов *Alcaligenes*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, однако лишь незначительно изменяли массивность биопленки родококков в сравнении с контролем. Разрушение выращенных биопленок грамотрицательных бактерий более выражено под влиянием олеофильных МУНТ, для грамположительных родококков значимых отличий от контроля не выявлено. Дыхательная активность стимулировалась при добавлении МУНТ к биопленкам некоторых родококков и ацинетобактерий, что может свидетельствовать о воздействии МУНТ на мембрану, либо о стрессовом состоянии клетки. При окраске красителем LIVE/DEAD® клеток биопленок, выращенных в присутствии МУНТ, выявлено снижение жизнеспособности, особенно значительное для *A. guillouiae* 11h.

Выводы. Таким образом, биопленки изученных штаммов грамотрицательных подвижных бактерий были более подвержены разрушению, чем биопленки грамположительных неподвижных родококков, но в то же время первые в присутствии МУНТ формировали более массивные биопленки, чем на питательной среде без наноматериалов. Родококки менее восприимчивы к присутствию нанотрубок, однако их дыхательная активность в присутствии МУНТ также увеличивалась, а жизнеспособность снижалась, особенно под влиянием карбоксилированных и гидрофильных МУНТ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 20-44-596002.

ГЕОРГИЙ ФРАНЦЕВИЧ ГАУЗЕ (1910–1986) — ЭВОЛЮЦИОНИСТ, ЭКОЛОГ, СОЗДАТЕЛЬ АНТИБИОТИКОВ (К 110-ЛЕТИЮ УЧЁНОГО)

Маланичева И. А.

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, instna@sovintel.ru
malanicheva.irina@yandex.ru

Г. Ф. Гаузе — доктор биологических наук (1936), профессор (1940), академик АМН СССР (1971), лауреат Сталинской премии (1946), награжден орденами и медалями. Научная биография учёного состоит из двух периодов.

С юности его интересовали вопросы теории эволюции и асимметрии протоплазмы. Итоги серий классических опытов на модели простейших, бактерий и дрожжей позволили ему переосмыслить понятие экологической ниши и обосновать закон конкурентного исключения (закон Гаузе). Эти работы принесли 24-летнему автору мировую славу как одному из основоположников современной экологии и соавтору синтетической теории эволюции.

С началом войны наступил второй, не менее блестящий период — в 1942 г. он (с биохимиком М. Г. Бражниковой) занялся поисками антибиотиков. У штамма *Bacillus brevis* var. G.-B. они обнаружили первый оригинальный отечественный антибиотик — грамицидин С (Советский), который успешно прошёл испытания в московских госпиталях, а затем в прифронтовой зоне 1-го Прибалтийского фронта. За разработку технологии производства грамицидина С в условиях военного времени в 1946 году Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражникова стали лауреатами Сталинской премии 3 степени.

В 1948 г. в АМН СССР была организована Лаборатория антибиотиков, а в 1953 г. — НИИ по изысканию новых антибиотиков, где под руководством Г. Ф. Гаузе были открыты антибактериальные (мономицин, колимицин, альбомицин, ристомидин, линкомицин, гелиомицин, эремомицин) и противопухольные (оливомицин, брунеомицин, рубомицин, карминомицин, блеомицетин) антибиотики.

Г. Ф. Гаузе готовил кадры для новой науки об антибиотиках, одним из основоположников которой он стал — читал курс лекций об антибиотиках на кафедре микробиологии Биофака МГУ, написал учебник по этим лекциям, был руководителем кандидатских и докторских диссертаций. Им опубликовано более 350 научных работ, 12 монографий.

Г. Ф. Гаузе активно сотрудничал в отечественных и международных научных организациях/обществах, был членом Польской и Нью-Йоркской Академий наук, экспертом ВОЗ, членом редколлегий советских и зарубежных профильных журналов.

Вклад Г. Ф. Гаузе в отечественную и мировую науку велик, его невозможно переоценить.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭТИОЛОГИИ КОНЪЮНКТИВИТОВ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ, ВЫДЕЛЕННЫХ МИКРОБНЫХ ПАТОГЕНОВ

Малышева В. С., Степаненко И. С., Аксенова С. В.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет
им. Н. П. Огарева

Введение. В норме здоровая глазная поверхность характеризуется относительно стабильным составом, сравнительно низким разнообразием бактерий, которые, по-видимому, играют определенную роль в поддержании гомеостаза путем модуляции иммунной функции. В этой связи перспективно исследование антибиотикочувствительности патогенов, вызывающих конъюнктивиты, как показателя динамики процессов адаптации микробиоты к иммунным и лекарственным стимулам, селекции штаммов. Цель работы: изучить уровень бактериальной этиологии конъюнктивитов и чувствительность выделенных штаммов к традиционным антимикробным препаратам.

Материалы и методы. В работе исследовались штаммы микроорганизмов, изолированных из материала, взятого у больных ГБУЗ РМ «РОБ» и ГБУЗ РМ «РИКБ» г. Саранска с признаками воспалительного процесса конъюнктивы глаза. Источником выделения патогенов служил отделяемое конъюнктивы глаза. Верификацию штаммов микроорганизмов проводили бактериологическими методами по классической методике (Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г.). Окончательную идентификацию и определение чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным препаратам проводили с помощью автоматической бактериальной системы «Sensititre» (УК).

Результаты и обсуждение. В результате исследования из 86 проб (с предварительным диагнозом бактериальный конъюнктивит) было выделено и изучено 30 штаммов микроорга-

низмов, дающих обильный рост и идентифицированных как представители родов *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. Из них *S.pyogenes* – 3 штамма, *S.pneumoniae* – 2 штамма, *S.mitis* – 1 штамм, *S.sanguinis* – 3 штамма, *S.uberis* – 2 штамма, *S.aureus* – 17 штаммов, *S.capitis* – 1 штамм, *S.homonis* – 1 штамм. Изучалась чувствительность исследуемых штаммов к традиционно применяемым противомикробным препаратам. При посеве остальных проб наблюдался рост нормальной микрофлоры глаза и/или единичных не типичных для данного биотопа колоний.

Выводы. В результате исследования определено, что наиболее частым возбудителем бактериальных конъюнктивитов, в исследованной группе пациентов, традиционно является *S.aureus* с различной чувствительностью к традиционно применяемым противомикробным препаратам. Выделено 2 штамма *S.aureus* MRSA. Стрептококки группы Viridans *S.mitis*, *S.sanguinis*, *S.uberis* являются представителями нормальной микрофлоры человека, но давали обильный рост на питательных средах, особенно у детей с признаками воспалительного процесса конъюнктивы глаз. Исследованные представители рода *Streptococcus* группы Viridans показали высокую устойчивость к антимикробным препаратам группы -лактамов. Результаты определения чувствительности *S.pyogenes* оказались противоречивыми и требуют дальнейшего изучения. Необходимо продолжить и расширить исследование бактериальной этиологии данной нозологии, так как чаще всего терапия воспалительных заболеваний глаз назначается без исследования этиологического агента.

ПЕРВЫЙ АВТОТРОФНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ РОДА THERMODESULFOVIBRIO

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

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
ФИЦ Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва
*an.malts@mail.ru

Автотрофная фиксация CO_2 является одним из наиболее важных биосинтетических процессов в природе. Способность к автотрофному росту была показана или предположена для большинства представителей филума *Nitrospirae*. Например, для представителей родов *Nitrospira* и *Leptospirillum*, показано наличие цикла Арнона, а у недавно описанной автотрофной бактерии *Dissulfurispira thermophila* присутствуют гены пути Вуда-Льюнгдала. И только для представителей рода *Thermodesulfovibrio* не удалось показать способность к автотрофному росту. В ходе исследования разнообразия механизмов автотрофной фиксации CO_2 у термофильных прокариот нам удалось выделить первого автотрофного представителя данного рода. Целью данной работы является полная физиологическая и филогенетическая характеристика нового изолята.

Из Столбовских термальных источников острова Кунашир с использованием модифицированной среды Пфеннига при 65 °C и pH 6,0 была выделена чистая культура штамма 3907-1М. Данный штамм рос в хемолитоавтотрофных условиях с H_2 в качестве донора электронов, $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ в качестве источника углерода и сульфатом в качестве акцептора электронов. Рост сопровождался потреблением 16,4 ммоль/л водорода и 4,2 мМ сульфатов, и образованием 3,5 мМ сульфида. Сульфид был единственным конечным продуктом в процессе сульфатного дыхания. Штамм 3907-1М был наиболее близок к *T. aggregans*, при этом последовательность гена 16S рРНК нового изолята имела сходство 97,65 % с гомологичной последовательностью *T. aggregans*. Средняя идентичность нуклеотидных последовательностей (ANI) геномов штамма 3907-1М и валидно описанных представителей рода *Thermodesulfovibrio* была определена с использованием ANI-калькулятора и составила 76–87 %, что значительно ниже 95 % межвидового барьера. На основании вышеприведённых результатов нами будет предложен новый вид в роде *Thermodesulfovibrio*.

Таким образом, в ходе проделанной работы выделен в чистую культуру и охарактеризован первый автотрофный представитель рода *Thermodesulfovibrio*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-54-12031 ННИО_а.

МЕТИЛОТРОФИЯ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *SPHAEROTILUS*

Марков Н. Д.* , Смольяков Д. Д., Ключева В. А., Грабович М. Ю.

Воронежский Государственный Университет

*nikita.markov257@mail.ru

Введение. Бактерии рода *Sphaerotilus* способны использовать разнообразный спектр соединений в качестве источника углерода и энергии, что предопределяет их широкое распространение и доминирование в определенных биотопах. Однако возможность к метилотрофному росту ранее не была продемонстрирована. Цель данной работы показать способность *S. sulfidivorans* D-507 и *S. montanus* HS^T к метилотрофному росту в присутствии метанола в качестве единственного источника углерода и энергии.

Материалы и методы: методы биоинформатики, биохимии, ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты и обсуждение. Получение геномных сиквенсов *S. montanus* HS^T и *S. sulfidivorans* D-507 в дополнение к уже существующим сиквенсам видов *Sphaerotilus* позволило провести сравнительный биоинформатический анализ путей метаболизма метанола. В геномах всех представителей были обнаружены гены метанолдегидрогеназы второго типа (*mdh2*), у *S. montanus* HS^T и *S. hippei* DSM 566^T также найдена метанолдегидрогеназа третьего типа (*хохF*). У всех обнаружены гены, тетрагидрофолятного пути окисления формальдегида; гены, кодирующие молибдензависимую форматдегидрогеназу. Дополнительно у *S. hippei* DSM 566^T и *S. montanus* HS^T были выявлены все гены тетрагидрометаноптеринового пути. Ни один из видов не обладает полным набором генов серинового и рибулозомонофосфатного цикла, но присутствуют все гены, необходимые для работы цикла Кальвина.

Для *S. montanus* HS^T и *S. sulfidivorans* D-507 был показан стабильный прирост белка при росте на метаноле (18–20 мг/л). Определена активность ключевых ферментов путей окисления метанола – метанолдегидрогеназы и форматдегидрогеназы; активность фосфорibuлокиназы и карбоангидразы. Для *S. sulfidivorans* D-507 определен уровень относительной экспрессии генов *rbcl*, *prkB* и *mdh2*; показано, что экспрессия генов в метилотрофных условиях возрастает в 325, 16 и 2,6 раз по сравнению с органогетеротрофными.

Выводы. Широкое распространение представителей рода *Sphaerotilus* в сочетании с высокой скоростью роста и способностью утилизировать метанол указывает на возможность использования *Sphaerotilus* в биотехнологических процессах, очистке сточных вод и получении дешёвого кормового белка.

ВЛИЯНИЕ ВНЕСЕНИЯ *SHEWANELLA ONEIDESIS* MR-1 НА БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ ПОЧВЕННОГО МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

Мелконян К. К.* , Табачникова А. А., Супрун И. В., Волченко Н. Н.

Кубанский государственный университет, Краснодар, rector@kubsu.ru

*010899karina@gmail.com

Микроорганизмы рода *Shewanella* являются одними из перспективных биотехнологических агентов в силу многообразия их физиологических свойств, способности к ассимиляции широкого ряда субстратов, а также способности к различным путям анаэробного дыхания. Одним из новых направлений их применения считаются микробные топливные элементы (МТЭ) – биоэлектрохимические устройства, вырабатывающие электроэнергию за счёт механизмов переноса электронов на биоанод.

Целью данного исследования являлась оценка спектра ассимиляции субстратов штаммом *Shewanella oneidensis* MR-1 и влияние его внесения на электрогенез МТЭ почвенного типа.

На первом этапе оценивали дыхательную активность шеванеллы методом микрореспираторного тестирования MicroResp, по количеству выделяемого углекислого газа. В качестве

субстратов применялись: сахароза, мальтоза, метионин, маннит, глюкоза, арабиноза, ксантин. Микроорганизм ассимилировал соединения, при добавлении сахарозы, D(+) мальтозы и L-метионина дыхательная активность наблюдалась – соответственно $36,6 \pm 1,38$, $36 \pm 3,54$ и $34,2 \pm 1,20$ мкг/г×ч (в контроле без внесения питательных субстратов – $26,3 \pm 0,60$ мкг/г×ч). Таким образом исследуемый штамм обладает широким ассимиляционным спектром, что потенциально может позволить конкурировать в почвенной среде за субстрат.

На втором этапе исследования биомассу *S. oneidensis* MR-1 инокулировали в МТЭ на основе чернозёма. Шеванеллу вносили в виде суспензии, смытой с плотной питательной среды уколом в область анода. Обнаружено, что инокуляция ячейки культурой *S. oneidensis* MR-1 вызывает рост электрогенеза на порядок: напряжение возрастало с уровня 40 мВ до величин в 600–700 мВ. Возрастание продолжалось 2–3 суток, сменившись на снижение до уровня 20–30 мВ на 9–10 сутки эксперимента.

В результате исследования изучены питательные потребности электрогенной культуры *S. oneidensis* MR-1, способной к ассимиляции разнообразных органических субстратов и эффект внесения её в почвенный МТЭ. Отмечено резкое, но непродолжительное увеличение электрогенеза, что может быть связано как с дефицитом питательных веществ для внесённой в почву биомассы клеток, так и конкурентными взаимоотношениями с аборигенной микрофлорой чернозёма.

ALGALTEXTILE — НОВЫЙ БИОГИБРИДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Мельникова А. А.^{1*}, Комова А. В.¹, Kuchendorf С.², Дмитриева Е. Д.¹, Намсараев З. Б.¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва

² Forschungszentrum Jülich GmbH, Wilhelm-Johnen-Straße, Jülich, Germany

* annfairstar@mail.ru

Актуальность и цель работы. В настоящее время в мире остро стоит задача повторного использования азота и фосфора из сточных вод, так как эти элементы при попадании в водоемы вызывают эвтрофирование, а фосфор, помимо того, является ценным исчерпаемым ресурсом. Для эффективной микробиологической очистки сточных вод, удобного сбора биомассы и утилизации микроводорослей мы разработали новый материал AlgalTextile.

Материалы и методы. AlgalTextile изготовлен из натуральных биоразлагаемых материалов: альгинатный гель с иммобилизованными внутри микроводорослями прикреплен к органической ткани. Были проведены следующие эксперименты: культивирование хлореллы в суспензии, с иммобилизацией в альгинатных шариках и AlgalTextile; применение AlgalTextile с разными концентрациями среды Trebon; применение сухого AlgalTextile; использование отработанного AlgalTextile в качестве удобрения для выращивания кресс-салата. В конце каждого эксперимента среда микроскопировалась на предмет наличия свободных клеток. Для работы была использована культура микроводоросли *Chlorella* IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana* Shihi-
ra & R.W.Krauss). Для моделирования условий сточных вод был разработан и собран в двух экземплярах открытый наклонный мини-фотобиореактор. Ежедневно отбирались пробы питательной среды для измерения содержания азота и фосфора системами кюветных тестов LCK349 и LCK138 (HACH). Для проверки возможности применения в качестве удобрения отработанного AlgalTextile использовались семена кресс-салата *Lepidium sativum*.

Результаты и обсуждение. Микроводоросли внутри AlgalTextile быстро производят биомассу, потребляя при этом большое количество питательных веществ из среды. За 10 дней AlgalTextile потребил 99,6 % фосфора (P-PO₄) и 76,1 % общего азота из среды Trebon. Высота кресс-салата с удобрением из AlgalTextile в среднем была на 35 % больше, чем у контрольных растений. Повторив эксперимент с высушенными AlgalTextile, мы показали, что он сохраняет свою активность через 28 дней после сушки, что позволяет удобно хранить, перевозить и быстро расстилать материал в месте использования.

Предварительная оценка возможной области применения AlgalTextile показывает, что его можно будет использовать для сезонной очистки сточных вод, очистки загрязнённых сто-

ков по почве, а также в качестве аналога "algal turf" для очистки эвтрофированных водоемов. Отработанный AlgalTextile может быть утилизирован в качестве биоудобрения, средства для борьбы с опустыниванием и сырья для биотоплива.

Заключение. AlgalTextile потребляет азот и фосфор лучше, чем почти все известные до сих пор микробиологические методы, значительно уступая только физико-химическим методам, а также анаммокс и денитрифицирующим бактериям в потреблении азота. Однако, AlgalTextile имеет ряд преимуществ: простота производства, компактность, возможность сезонного использования и рециркуляции питательных веществ при использовании в качестве эффективного удобрения.

БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ТЕННАНТИТА И ЭНАРГИТА УМЕРЕННО-ТЕРМОФИЛЬНЫМИ АЦИДОФИЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Мельникова Е. А.^{1,2}, Елкина Ю. А.¹, Меламуд В. С.¹, Булаев А. Г.¹

¹ Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва,
² ГНЦ РФ – институт медико-биологических проблем РАН, Москва

В настоящее время в металлургии меди существует проблема вовлечения в переработку руд, содержащих токсичные примеси, например, мышьяк, что приводит к ряду трудностей при применении пирометаллургических технологий. Альтернативой для переработки сульфидных руд, в том числе медных, являются биогидрометаллургические технологии, в основе которых лежит процесс окисления сульфидных минералов ацидофильными микроорганизмами.

Целью данной работы было изучение процесса биовыщелачивания халькопирита (CuFeS_2), энаргита (Cu_3AsS_4) и теннантита ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) при различных условиях (температура от 40 до 60°C, присутствие в среде ионов Fe^{2+} , пирита (FeS_2) и пирротина (FeS)) чистыми и смешанными культурами микроорганизмов – представителей групп, доминирующих в технологических процессах (*Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma sp.* MBA-1). Опыты проводили в колбах со 100 мл жидкой минеральной питательной средой и 2 г минерала на шейкере (200 об./мин) в течении 30 сут.

Скорость биовыщелачивания меди из халькопирита и энаргита в большей степени зависела от температуры и практически не зависела от состава культуры. За 30 сут. эксперимента в оптимальных условиях (50–55 °C) из халькопирита было выщелочено 25–27 % меди, а из энаргита – 14 % меди. Повышение температуры до 60°C ингибировало биовыщелачивание меди. Оптимальной температурой для биовыщелачивания теннантита было 45 °C, при этом скорость биовыщелачивания существенно зависела от состава микробной культуры. В эксперименте со смешанной культурой всех трех штаммов было выщелочено 26 % меди, тогда как в экспериментах с чистыми культурами *A. caldus* MBC-1, *S. thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma sp.* MBA-1 за 30 сут. – 12, 21 и 18% меди соответственно. Внесение в среду Fe^{2+} , пирита и пирротина в виде сульфата позволило увеличить степень выщелачивания меди из энаргита и теннантита.

Таким образом, разные факторы среды по-разному влияли на биовыщелачивание минералов меди, что должно учитываться, в том числе, при планировании испытаний по биовыщелачиванию минерального сырья.

ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНОК PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Миронова А. В., Тризна Е. Ю., Каюмов А. Р.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
*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 *S. aureus* против биопленок *P. aeruginosa*.

Материалы и методы. Жизнеспособность открепившихся клеток и клеток в составе биопленок после обработки антимикробными препаратами проверяли с помощью подсчета КОЕ.

Результаты. На первом этапе проведена оценка влияния культуральной жидкости *S. aureus* на жизнеспособность *P. aeruginosa* 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*.

Чтобы выявить продукцию наибольшего числа внеклеточных метаболитов *S. aureus* проводили подбор условий культивирования. Внесение культуральной жидкости *S. aureus*, полученной в результате азрируемого роста приводило к гибели открепившихся клеток *P. aeruginosa* при концентрации жидкости 25 %, а клеток в биопленке при концентрации 50%. Культуральная жидкость *S. aureus*, полученная при формировании биопленок была менее эффективна.

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*.

Выводы. 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*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №20-64-47014).

ФОСФОМАННОЗИЛИРОВАНИЕ СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ У ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* ЗАВИСИТ ОТ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ *MNN2* И *ABV1*

Митькевич О. В., Кулакова М. В., Агафонов М. О.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, info@fbras.ru

Гены *ABV1* и *MNN2* дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* кодируют ферменты аппарата Гольджи, маннозилфосфаттрансферазу (*Abv1*) и α 1,2-маннозилтрансферазу (*Mnn2*), соответственно. Первый из них был выявлен нами ранее по эффектам на регуляцию транспорта фосфата, а мутация во втором гене была отобрана по увеличению чувствительности к детергенту. Мы обнаружили, что нарушение генов *ABV1* и *MNN2* *O. parapolyomorpha* сильно снижает окрашивание клеток альциановым синим, что свидетельствовало о дефекте фосфоманнозилирования белков клеточной стенки. Однако оставалось не ясным, является ли этот эффект специфичным по отношению к белкам клеточной стенки или белки *Abv1* и *Mnn2* влияют и на фосфоманнозилирование белков, секретируемых в культуральную среду. Для ответа на этот вопрос мы изучили влияние генов *ABV1* и *MNN1* на заряд гликозидов двух секретируемых белков-репортеров гликозилирования – эндогенной хитиназы (белок, содержащий только O-связанные гликозиды) и глюкозооксидазы *Aspergillus niger*, содержащей несколько участков N-гликозилирования. С этой целью была определена электрофоретическая подвижность этих белков в неденатурирующих условиях без детергента и после прогревания в присутствии додецилсульфата натрия. Влияние N-связанных гликозидов на заряд белка определяли, сравнивая электрофоретическую подвижность глюкозооксидазы до и после удаления N-гликозидных цепей. И для хитиназы и для глюкозооксидазы был проведен подбор условий для проведения электрофореза, в которых происходит наиболее эффективное разделение форм белка, отличающихся по заряду гликозидных цепей. Мы показали, что и *Abv1* и *Mnn2* влияет на заряд как N-, так и O-связанных гликозидов в составе секретируемых белков *O. parapolyomorpha*. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00330.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eEF1A НА НОНСЕНС-СУПРЕССИЮ

Михайличенко А. С.^{1*}, Матвеевко А. Г.¹, Журавлева Г. А.¹

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, spbu@spbu.ru
*anast1221@gmail.com

Введение. Гены *TEF1* и *TEF2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеют почти идентичные рамки считывания и оба кодируют фактор элонгации трансляции eEF1A. Ранее было показано, что некоторые доминантные мутации в данных генах влияют на нонсенс-супрессию. Чтобы понять механизмы этого влияния, мы задались целью попробовать получить аналогичные рецессивные мутации, а также отработать способ получения мутантов по данным генам.

Материалы и методы. Ранее были получены штаммы, у которых ген *TEF1* либо *TEF2* был делетирован. Мы использовали их для получения штаммов, содержащих мутантную аллель в качестве единственного гена *TEF1/2*. Для отработки способа получения мутантов нами была выбрана описанная ранее супрессорная аллель *TEF2-4*. Первый способ заключался во встраивании мутации *TEF2-4* вместо *TEF2* в штаммы с делецией *TEF1*. Второй - в делеции гена *TEF1* у штаммов, содержащих делецию *TEF2*, и одновременным встраиванием плазмиды с *TEF2-4*. Таким образом, мы планировали получить штаммы, у которых мутантная аллель *TEF2-4* кодировала бы единственную форму eEF1A, присутствующую в клетке. В обоих случаях мы использовали систему CRISPR/Cas9.

Результаты и обсуждение. Нами было показано, что делеция гена *TEF1* ослабляет нонсенс-супрессию, вызванную прионом [*PSI⁺*], в меньшей степени, чем делеция гена *TEF2*. Данные гены находятся на разных хромосомах и под разными промоторами, что может объяснять разницу во влиянии каждого из генов на нонсенс-супрессию. Также нам удалось получить мутантные штаммы первым и вторым способами. С помощью этих штаммов было показано, что нонсенс-супрессия усиливается, когда аллель *TEF2-4* присутствует в качестве единственного источника eEF1A по сравнению со штаммами, содержащими единственную аллель *TEF2* дикого типа.

Заключение. Мы показали, что получение мутантных аллелей *TEF* первым способом хоть и низкоэффективно, но возможно. Эффективность же второго способа оказалась крайне низка, однако в процессе работы удалось получить штаммы с делециями *TEF1* и *TEF2*, у которых ген *TEF2* находится на плазмиде. Данные штаммы мы планируем использовать для получения мутантов по генам *TEF1/2* с помощью плазмидного шаффлинга.

Работа поддержана РЦ РМИКТ НП СПбГУ и грантами РФФИ 18-14-00050 и РФФИ 20-34-70156.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ЛИПОЛИТИКОВ В ПОЧВЕ И ЛИПИДСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДАХ ГОРОДА КРАСНОДАРА

Моисеева Е. В.^{1*}, Худокормов А. А.¹, Самков А. А.¹, Волченко Н. Н.¹, Круглова М. Н.¹, Ревенко Н. М.², Вотчель Д. Р.¹, Карасева Э. В.¹

¹Кубанский государственный университет, Краснодар, microgenbio@yandex.ru

²Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 имени профессора С. В. Очаповского», Краснодар

*moisieieva97@inbox.ru

За последнее время ускоряется темп образования отходов, в состав которых входят растительные масла и животные жиры. При попадании липидсодержащих отходов в природную среду затрудняется доступ кислорода, что может привести к уменьшению биоразнообразия. Утилизация данных отходов имеет длинный цикл подготовки и заканчивается сжиганием. Биотехнологический метод разложения липидов основывается на способности микроорганизмов разлагать липиды с помощью ферментов липаз. Данный метод экологичен, не требует

больших материальных и трудовых затрат. Аборигенная микрофлора липидзагрязненных объектов представлена липолитическими бактериями, которые устойчивы к негативному влиянию липидов и используют их в качестве источника углерода и энергии. Эффективность деструкции липидов можно увеличить за счет подбора штамма-продуцента липаз. Поэтому целью данной работы являлось выделение высокоактивных штаммов бактерий липолитиков из загрязненных липидами объектов. Основными сложностями при поиске и выделении штаммов с липолитической активностью являются физические свойства липидов – гидрофобность и нерастворимость в неорганических растворителях, что обуславливает низкую скорость разложения микроорганизмами этих субстратов. В связи с этим увеличивается время, необходимое для выявления продуцентов липаз, усложняется методика проведения эксперимента.

На территории города Краснодар отбирались пробы почвы, в которые впоследствии вносили масло и жир. Также отбирали образцы на масложиркомбинате «Краснодарский», а именно, воды из жиросепараторов, фильтровального порошка и жировых погон. Все пробы, за исключением воды, смешивались в соотношении 1:10 с физиологическим раствором и перемешивались на орбитальной качалке при 170 об/мин в течение 30 минут. Высеивали на МПА и минеральную среду с подсолнечным маслом в качестве единственного источника углерода. Выделенные штаммы для подтверждения их липолитической активности культивировали на жидкой и плотной минеральной среде с маслом и жиром. Все выделенные штаммы идентифицировали методом MALDI-TOF.

Из липидзагрязненной почвы идентифицировано 35 штаммов, относящихся к филумам Actinobacteria (11,4 %), Proteobacteria (74,3%), Firmicutes (14,3 %). Внутри филума Proteobacteria 61,5 % штаммов относится к классу Gammaproteobacteria, представленный порядком Enterobacteriales и порядком Pseudomonadales. На территории МЖК выделен 1 штамм рода Bacillus, 4 штамма филума Proteobacteria – Burkholderia, Pseudomonas, Pluralibacter. Половина выделенных на МЖК бактерий относилась к условно-патогенным микроорганизмам, поэтому их дальнейшее применение нецелесообразно. Отобраны для дальнейших исследований штаммы Arthrobacter pascens 03MZ, A. pascens 03MZ, A. polychromogenes 116Z.

Культивируемые липолитические микроорганизмы липидзагрязненных объектов представлены различными представителями филума Proteobacteria, реже встречаются штаммы, входящие в состав филумов Actinobacteria и Firmicutes.

СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛЯ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЕРВИЧНОГО КСИЛОТРОФА *TRAMETES HIRSUTA* И ВТОРИЧНОГО КСИЛОТРОФА *PENIOPHORA LYCII* ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНОЙ ДРЕВЕСИНЕ

Моисеенко К. В. , Савинова О. С., Глазунова О. А., Фёдорова Т. В.*

Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва

*mr.moiseenko@gmail.com

Сапротрофные базидиальные грибы являются неотъемлемой частью любой лесной экосистемы. Участвуя во всех этапах деградации древесины, эти грибы играют фундаментальную роль в углеродном балансе, почвообразовании и лесовосстановлении. Современные исследования ясно показывают, что сообщества грибов, вовлеченные в разные стадии деградации древесины, качественно различаются как по видовому составу, так и по общим биохимическим процессам. В данном исследовании проведено сравнение профиля секретиремых ферментов первичного ксилотрофа *T. hirsuta* и вторичного ксилотрофа *P. lycii* при росте на различной древесине.

T. hirsuta и *P. lycii* культивировали полу-твердофазным способом в течении месяца на глюкозо-пептонной среде, содержащей опилки различной древесины – березы (**ГпБ**), ольхи (**ГпО**) и сосны (**ГпС**). Культуральную жидкость концентрировали, высаживали белки и разделяли двумерным гель-электрофорезом. Подвергнутые трипсинолизу белковые пятна идентифицировали на приборе MALDI TOF/TOF MS/MS.

Показано значительное различие профилей секретируемых белков для *T. hirsuta* и *P. lycii*, причем наиболее существенные отличия обнаружены для ферментов лигнолитического комплекса. Для *T. hirsuta* основными секретируемыми ферментами являлись пероксидазы. На всех средах наблюдалась значительная секреция изоферментов марганец (MnP5) и версатил (VP2) пероксидаз. Дополнительно, на среде **ГпС** наблюдалась секреция лигнин пероксидазы LiP9. Также, на всех средах в незначительном количестве присутствовал изофермент лакказы – LacA, а на среде **ГпБ** было зафиксировано дополнительное наличие изофермента LacC. Экзопроотеомы *P. lycii* характеризовались полным отсутствием лигнолитических пероксидаз. На всех средах наблюдалась преобладающая секреция FAD-binding domain-containing protein – ранее не описанного белка, который предположительно является основным лигнолитическим ферментом для данного гриба. Также, на средах **ГпБ** и **ГпО** наблюдалась секреция двух изоферментов лакказ – LacA и Lac5.

Таким образом на примере *T. hirsuta* и *P. lycii* было показано существенное различие комплекса лигнолитических ферментов древоразрушающих грибов из разных экологических ниш.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант РФФИ 19-04-01183.

ВИРИОПЛАНКТОН, КАК ОБЫЧНЫЙ И МАССОВЫЙ КОМПОНЕНТ РЕЧНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ, РЕАГИРУЮЩИЙ НА СТЕПЕНЬ ЕЕ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

^{1,2}Мошарова И. В., ¹Ильинский В. В., ¹Козлова И. А.

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, info@mail.bio.msu.ru

²Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН, Москва, office@ocean.ru

Введение. За последние два десятилетия научное сообщество признало планктонные вирусы важным биологическим компонентом водных экосистем и заключило, что они являются «основными игроками» в глобальных экосистемах (Jacquet et al., 2010; Cabral et al., 2017).

Экологическая роль вириопланктона (ВП) в водных экосистемах весьма велика и связана с его способностью регулировать численность большинства гидробионтов, в первую очередь – наиболее массовых их представителей, т. е. бактерий, цианобактерий, и эукариотного фитопланктона, а также влиять на потоки вещества и энергии в микробной «петле» и на горизонтальный перенос генов. Учитывая высокую значимость вирусов в водных экосистемах, а также недостаток информации по этой проблеме для водотоков, в первую очередь – крупных рек, протекающих через индустриальные территории, была определена цель настоящей работы: исследовать сезонную динамику численности ВП на двух участках реки Москвы, испытывающих разный уровень антропогенной нагрузки.

Материалы и методы. Отбор проб воды проводили на р. Москве с 19.09.2019 по 11.03.2020 гг. Первая станция располагалась на входе реки в г. Москву, в районе Тушино (ст. Тушино), а вторая – сразу за пределами г. Москвы, в подмосковном городе Дзержинский (ст. Дзержинский).

Количественный учет ВП проводили методом эпифлуоресцентной микроскопии с использованием красителя SYBR Green I (Noble, Fuhrman, 1998). Этим же методом, но с применением красителя DAPI (Porter, Feig, 1980), определяли общую численность бактерий.

Результаты и обсуждение. Максимально высокая средняя численность ВП была зафиксирована в водах наиболее загрязненной ст. Дзержинский – она была почти в 2 раза выше, чем таковая в водах более чистой ст. Тушино (средние значения составили $253,6 \pm 71,5$ и $129,0 \pm 39,6$ млн частиц/мл, соответственно).

В водах ст. Дзержинский пиковые значения обилия вириопланктона дважды были отмечены в сентябре (316,51 и 337,48 млн ч./мл.), в конце ноября численность ВП снижалась до 171,60 млн ч./мл. В водах фоновой ст. Тушино максимумы обилия ВП отмечались в осенний период – с середины октября по начало ноября (120,12 и 186,85 млн ч./мл), затем зна-

чения этого параметра снижались. Была обнаружена значимая корреляционная связь между численностью ВП и бактериопланктона ($r = 0,47$, $p < 0,01$). Можно предполагать доминирование в популяции речного ВП в первую очередь вирусов-бактериофагов.

Вывод. ВП является обычным и наиболее массовым компонентом исследованных участков реки Москвы, реагирующим на степень их антропогенной нагрузки, что позволяет рекомендовать этот параметр для включения в программу комплексных мониторинговых наблюдений за состоянием водных экосистем.

Работа выполнена в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М. В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА УГЛЕВОДОРОДОВ *PSEUDOMONAS VERONII* 7-41 В МОНО- И БИСУБСТРАТНЫХ СИСТЕМАХ

Муллаева С. А., Иванова А. А., Сазонова О. И., Петриков К. В., Делеган Я. А.,
Ветрова А. А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К.Скрябина – ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, sv.bolshanina@gmail.com

Способность к деградации углеводов широко распространена среди природных микроорганизмов. Типичными углеводородокисляющими бактериями являются штаммы рода *Pseudomonas*. Цель данной работы – определение генетических аспектов систем биодеградации углеводов и изучение физиолого-биохимических особенностей штамма *P. veronii* 7-41 в моно- и бисубстратных системах.

Был собран и проаннотирован геном штамма *P. veronii* 7-41. В исследуемом штамме присутствуют генетические системы, отвечающие за деградацию и алканов, и ПАУ, причем их организация соответствует организации классических оперонов, описанных для деструкторов отдельных классов субстратов.

В бисубстратной системе, содержащей и декан, и нафталин, штамм 7-41 сначала потреблял алкан, а деградация ПАУ начиналась на более поздних этапах роста. При этом наблюдалось снижение численности бактерий и степени деградации субстратов по сравнению с ростом в моносубстратных системах. Вероятно, это связано с влиянием декана или продуктов его метаболизма на ферментные системы деградации катехола, как по *мета*, так и по *орто*-пути, поскольку было отмечено отсутствие активности катехол-2,3- и катехол-1,2-диоксигеназы. При этом активность двух других ключевых ферментов окисления нафталина (нафталин 1,2-диоксигеназы и салицилатгидроксилазы) в бисубстратной системе была даже выше, чем при росте только на нафталине. Можно предположить, что алифатический субстрат влияет на регуляцию экспрессии отдельных элементов пути деструкции ПАУ, в частности, отвечающих за окисление катехола.

В дальнейшем для выявления закономерностей взаимодействия нескольких систем метаболизма в зависимости от условий роста будут использованы транскриптомный и протеомный подходы для комплексной оценки всех изменений экспрессии генов и белков.

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *Corynebacterim glutamicum* НАПРАВЛЕННОГО НА БИОСИНТЕЗ ПРОПИОНАТА

Мустахимов И. И.*, Решетников А. С., Бут С. Ю.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН,
ФИЦ «Пушкинский Научный Центр Биологических Исследований РАН», Пушкино
*mii80@rambler.ru

Пропионовая кислота (ПК) широко используется в качестве добавки к кормам животных, а также в производстве пластмасс на основе целлюлозы, гербицидов и парфюмерии. Альтернативным химическому производству ПК является путь биотехнологической ферментации из дешевых субстратов. У бактерий синтез пропионовой кислоты происходит в транскарбоксилазном пути и акрилатном цикле. Транскарбоксилазный путь функционирует у пропионобактерий, тогда как путь акриловой кислоты ограничивается несколькими микроорганизмами, такими как *Clostridium propionicum*, *Megasphaera elsdenii* и *Prevotella ruminicola*.

В нашей работе мы метаболически сконструировали штамм *Corynebacterium glutamicum*, с генами акрилатного пути из *C. propionicum*, способного синтезировать пропионовую кислоту. Была использована система CRISP-Cpf1, предложенная для *C. glutamicum* (Jiang et al., 2017). Для контролируемой экспрессии генов акрилатного цикла в хромосому *C. glutamicum* был интегрирован оперон кодирующий репрессор LacI и вирусную SP6-полимеразу. Гены, кодирующие акрилатный путь, были клонированы в две совместимые плазмиды pJYS3 и pJYS2. Гены кодирующие: D-лактатдегидрогеназу (ldhD) из лактобациллы *Lactobacillus delbrueckii*, пропионил-КоА-редуктазу (Pct) из *C. propionicum* и акрилоил-КоА-редуктазу (acul-mut156, мутантная форма фермента с высоким сродством к НАДН) из *E. coli* были клонированы под промотор SP6 в плазмиду pJYS3 с образованием вектора pJYS5. Оперон, кодирующий три гена D-лактоил-КоА-дегидрогеназу из *C. propionicum*, клонировали в pJYS2 под промотор SP6 с получением вектора pJYS-Lsd. Полученными плазмидами pJYS5 и pJYS-Lsd трансформировали в *C. glutamicum* M2 и отбирали устойчивые колонии к канамицину и спектомицину. Полученный штамм *C. glutamicum* M2 с векторами pJYS5 и pJYS-Lsd выращивали аэробно на среде ВНИ до 1ед ОП, затем штамм культивировали анаэробно с добавленным ИПТГ. ВЭЖХ анализ культуральной среды штамма *C. glutamicum* выявил накопление до 200мМ пропионата (около 14 гр/л), что указывает на функционирование генетически сконструированного акрилатного цикла в *C. glutamicum*.

Дальнейшее направление работы связана с подбором оптимальных биотехнологических параметров для увеличения накопления ПК в культуральной среде.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-07044 мк.

ТОЛС-СОДЕРЖАЩИЕ ПОМПЫ МЛУ БАКТЕРИЙ: ЧТО МЫ ЗНАЕМ О НИХ И О ЧЕМ ОНИ МОГУТ НАМ РАССКАЗАТЬ

Назаров П. А.^{1,2}, Шевченко С. А.³, Каракозова М. В.⁴

¹МФТИ

²НИИ ФХБ им Белозерского МГУ

³Биологический факультет МГУ

⁴Сколковский институт науки и технологии

Помпы множественной лекарственной устойчивости являются краеугольным камнем защиты клеток от токсичных факторов, поступающих извне. Существует несколько типов помп МЛУ, и они по-разному представлены у разных клеток. Часть из них использует энергию гидролиза АТФ для откачки токсичных веществ, тогда как другие используют протонный градиент на мембране. Клетки эукариот и прокариот отличаются по составу помп, так же как и бактерии различаются между собой. Грамотрицательные бактерии имеют более сложно-строенную клеточную стенку, чем грамположительные, и для откачки используют более сложные помпы МЛУ. Одними из таких помп являются TolC-содержащие помпы.

Без сомнения, самой известной помпой МЛУ у самой изученной бактерии *Escherichia coli*, является помпа AcrAB-TolC, которая будучи основной помпой МЛУ откачивает широкий спектр субстратов, таких как антибиотики (хлорамфеникол, ампициллин), красители (родамин 6G), детергенты (SDS), органические вещества (гексан), и многие другие. Она состоит из протон-зависимой помпы внутренней мембраны AcrB, периплазматического адаптерного липопротеида AcrA и канала наружной мембраны TolC.

Удивительно, но белок TolC принимает участие не только в образовании помпы AcrAB-TolC, но и других семи помп: AcrAD-TolC, AcrEF-TolC, MdtABC-TolC, MdtEF-TolC, MacAB-TolC, EmrAB-TolC и EmrKY-TolC. При этом TolC-содержащие помпы принадлежат к разным

типам, и могут быть как протон-зависимыми так и АТФ-зависимыми. Удаление гена *tolC* ожидаемо приводит к потере сразу восьми МЛУ помп, что является великолепным инструментом изучения работы МЛУ помп и их защитного действия на бактериальную клетку.

На примере различных веществ (антибиотиков, красителей, разобщителей окислительного фосфорелирования, детергентов и др.) с использованием стандартных микробиологических методов, молекулярного докинга, биофизических и биохимических методов будет показано, как помпы распознают свои субстраты, и как эти знания помогают лучше понять физиологию и устойчивость бактерий.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА АЗОТА НА ПРОДУКЦИЮ БИОСУРФАКТАНТОВ БАКТЕРИЯМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Нечаева И. А.

Тульский государственный университет, 300012, Тула, info@tsu.tula.ru
nechaeva1902@gmail.com

Биосурфактанты являются перспективными продуктами микробного синтеза в плане биотехнологического применения, поскольку для культивирования их продуцентов используют простые по составу питательные среды, доступные источники углерода, в том числе отходы различных производств.

Ранее было показано, что бактерии, входящие в состав биопрепарата «МикроБак», применяемого для очистки нефтезагрязнённых территорий, синтезируют биосурфактанты гликолипидной природы (рамнолипиды и трегалолипиды). Однако для увеличения количества продуцируемых биосурфактантов необходимо подбирать условия ферментационных процессов, в частности варьируя состав питательной среды. При составлении сред для культивирования микроорганизмов-продуцентов биосурфактантов важное значение имеет подбор источника азота.

Целью данной работы являлась оценка влияния источника азота в составе питательной среды на образование биосурфактантов.

Используемые в работе штаммы-деструкторы углеводородов нефти *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141, pBS1142) и *Rhodococcus* sp. 3–2 культивировали на питательной среде Эванса при 26 °С до наступления стационарной фазы роста с использованием в качестве единственного источника углерода и энергии гексадекана.

Количественное определение рамнолипидов и трегалолипидов проводили по измерению содержания рамнозы или трегалозы в культуральной жидкости и в дальнейшем делали перерасчёт на соответствующие молекулы биосурфактантов. Рамнозу и трегалозу определяли спектрофотометрически фенольно-серным методом.

Согласно литературным данным, оптимальным источником азота в составе минеральной среды являются нитратные соединения. В среде Эванса азот находится в аммонийной форме, поэтому проводили сравнение количества продуцируемых биосурфактантов с использованием азота в аммонийной и нитратной формах.

Проведённые эксперименты показали, что при включении в состав питательной среды азота в виде NH_4Cl образуется 0,67 г/л и 0,26 г/л рамнолипидов и трегалолипидов, соответственно. При использовании азота в виде NaNO_3 бактерии продуцируют 0,64 г/л и 0,45 г/л рамнолипидов и трегалолипидов, соответственно. Следует отметить, что источник азота не оказывает влияния на количество продуцируемых биосурфактантов штаммом *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141, pBS1142). Возможно, следует учитывать ещё и концентрацию азота в среде. Известно, что рост микроорганизмов в условиях азотного лимитирования сопровождается значительным увеличением количества синтезируемых биосурфактантов.

Таким образом установили, что продукция биосурфактантов гликолипидной природы возросла при изменении источника азота с аммонийной на нитратную форму в составе питательной среды только для бактерий-деструкторов углеводородов нефти рода *Rhodococcus*.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИАЗОЛИДИНАММОНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРАТ-ИОНАМИ ЙОДА, В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Нечаева О. В.^{1,2*}, Тихомирова Е. И.¹, Шульгина Т. А.³, Шнайдер Д. А.²,
Заярский Д. А.¹, Беспалова Н. В.¹

¹Саратовский государственный технический университет им. Ю. А. Гагарина

²Саратовский областной клинический кожно-венерологический диспансер

³Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и нейрохирургии

*olgav.nechaeva@rambler.ru

В настоящее время в медико-биологической практике широкое применение находят полимерные соединения с антимикробными свойствами, среди которых одним из перспективных является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М). Цель работы – обосновать использование ПААГ-М при разработке препаратов.

Работа по исследованию биологической активности ПААГ-М проводилась с 2011 г. на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского и кафедры «Экология» СГТУ имени Гагарина Ю.А. Оценка антимикробных свойств полимера показала, что он характеризуется широким спектром антимикробной активности в отношении стандартных и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, в т.ч. и их биопленочных форм, а также РНК-содержащего вируса возбудителя трансмиссивного гастроэнтерита свиней. Комплексная оценка токсичности ПААГ-М на биотест-объектах (*Daphnia magna* Straus, *Clorella vulgaris*), лабораторных животных и культуре клеток дермальных фибробластов человека (HDF) позволила отнести его к IV классу токсичности, т. е. к нетоксичным соединениям. Широкий спектр антимикробной активности и биологическая безопасность явились основанием для разработки на его основе высокоэффективных антисептических и дезинфицирующих средств.

Полимеры широко применяются в качестве стабилизаторов наночастиц. Было установлено, что структуры «ядро-оболочка» на основе наноагрегатов флавоноидов, стабилизированных ПААГ-М, сохраняли свою стабильность и наноразмерность в течение длительного времени. Изучение их ранозаживляющих свойств показало, что обработка препаратом экспериментальных неосложненных и гнойных ран приводила к сокращению сроков их заживления в 1,8–2,2 раза по сравнению с контролем. На основании полученных результатов было разработано косметическое средство «Меллисол», которое в настоящее время успешно применяется для лечения акне, микробной экземы и других инфекционных поражений кожи у пациентов ГУЗ СОККВД. ПААГ-М был использован в качестве стабилизатора в составе водных дисперсий наночастиц серебра и золота, полученных биохимическим синтезом. Выявлена его высокая стабилизирующая способность, обеспечивающая сохранение размеров и основных биологических свойств металлических наночастиц в течение не менее чем 24 месяцев. Исследования антимикробной активности водных дисперсий серебра и золота, стабилизированных ПААГ-М, позволили установить высокую чувствительность к ним стандартных и клинических штаммов условно-патогенных микроорганизмов. На основе водной дисперсии наночастиц серебра, стабилизированных ПААГ-М, разработано высокоэффективное антисептическое средство. Показана высокая эффективность водной дисперсии наночастиц золота при проведении фотодинамической антимикробной терапии экспериментальных гнойных ран, позволяющая сократить сроки их заживления в 2,5 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные результаты показали, что благодаря высокой антимикробной активности, стабилизирующей способности и низкой токсичности ПААГ-М может использоваться при разработке широкого спектра препаратов для медико-биологической практики.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ВОДЫ ОТ АЗОТА ПО ТЕХНОЛОГИИ НИТРИТАЦИЯ/АНАММОКС

Николаев Ю. А. , Дорофеев А. Г.** , Грачев В. А. , Каллистова А. Ю. ,
Берестовская Ю. Ю. , Пименов Н. В.*

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
*NikolaevYA@mail.ru, **DorofeevAG@mail.ru)

Очистка сточных вод от азота остаётся актуальной задачей, особенно в ситуации сокращения запасов чистой воды и продолжающегося загрязнения окружающей среды. Наиболее перспективный путь решения этой проблемы – использование биологических методов извлечения азота на основе автотрофного процесса Анаммокс. Технология удаления азота представляет собой последовательность двух процессов: частичной нитрификации аммония с образованием нитрита, и дальнейшего анаэробного окисления анаммокс-бактериями оставшегося аммония образовавшимся нитритом.

С применением пакета прикладных программ BioWin (EnviroSim Associates Ltd., Канада) проведено математическое моделирование очистки воды от соединений азота по технологии «нитритация/анаммокс» в биореакторе с загрузкой. Моделировали как стационарные состояния, устанавливающиеся при концентрации аммония в подающейся в биореактор среде 200 и 500 мг N-NH₄, так и процесс перехода от одного стационарного состояния к другому после резкого изменения нагрузки по аммонiu. Результаты моделирования сравнивали с экспериментальными данными.

После корректировки используемых в BioWin по умолчанию коэффициентов были получены близкие к экспериментальным данным расчетные значения концентраций азот-содержащих компонентов в стационарном состоянии при концентрации аммония в подающейся в биореактор среде 200 мг/л. Расчет показал, что резкое повышение концентрации аммония в поступающей среде с 200 до 500 мг N-NH₄ приводит к быстрому снижению эффективности удаления азота, но затем в течение месяца эффективность повышается до уровня, близкого исходному (77%). Однако экспериментальные данные не подтвердили результаты расчетов: после быстрого падения эффективности сразу после увеличения нагрузки, возрастания эффективности удаления азота в течение 30 суток не наблюдали. Вероятной причиной расхождения экспериментальных и расчетных данных могут быть изменения структурно-функциональных характеристик биопленок, а также высокая токсичность аммония для членов анаммокс-сообщества, не учитывающиеся при моделировании.

Для более глубокого понимания протекающих в биопленках процессов и повышения эффективности использования моделирования в технологических расчетах необходимы дальнейшие экспериментальные исследования и развитие математического аппарата описания биопленок.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-08008) и Госзадания Минобрнауки для ФИЦ Биотехнологии РАН.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ЖИДКИХ ПРЕПАРАТОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Николаев¹ Ю. А. , Дёмкина¹ Е. В. , Канапацкий¹ Т. А. , Борзенков¹ И. А. , Лойко¹ Н. Г. ,
Григорьева¹ Н. В. , Манучарова² Н. А. , Эль-Регистан¹ Г. И.*

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

²Факультет почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова, timkanap_inmi@mail.ru

Биоремедиация является самым экологичным и экономичным способом очистки почв и вод, загрязненных нефтепродуктами. Жидкие биопрепараты для биоремедиации почв и вод удобны в применении и привлекательны экономически, однако их главный недостаток – быстрая гибель микроорганизмов в процессе транспортировки и хранения. По этой причине

актуальным является стабилизация жидких препаратов углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), т. е. продление сроков поддержания высокого титра жизнеспособных клеток (КОЕ). Для этих целей были разработаны подходы, заключающиеся в повышении в популяциях УОМ уровня клеток-персистеров, созревающих в формы покоя (ПФ) с применением гуматов (ГВ), в иммобилизации клеток УОМ на микрокапсулах (МК) из полимочевины с добавлением хитозана или из полимолочной кислоты, а также в гели на основе силанольных производных гуматов (СПГВ). Разработанные подходы приводят к существенному, до 3х порядков повышению титра КОЕ относительно нестабилизированного контроля. Целью настоящего исследования было изучить биологические свойства таких биопрепаратов и оценить их способность к деструкции нефтепродуктов.

Объектами исследования были УОМ, которые выращивали до стационарной фазы роста и стабилизировали одним из вышеописанных методов. Полученные культуры (биопрепараты) исследовали методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, световой микроскопии, микробной физиологии роста (рост в экстремальных условиях, деструкции нефтепродуктов в жидких средах и почвенных микрокосмах, определяемая по накоплению CO₂).

Биологические свойства стабилизированных культур существенно отличались от свойств стандартных культур. Стабилизированные культуры характеризовались расширенным спектром диссоциантов (диагностируемых по множеству морфологических и физиологических признаков).

Выращивание культур УОМ в присутствии МК приводило к обильной адгезии бактерий на их поверхности, и развитию биопленок (подтверждаемому наличием обильного матрикса).

Иммобилизация в гель из СПГВ приводила к замедлению или отсутствию отмирания клеток при хранении в обычных условиях в течение нескольких месяцев, высокой гетерогенности культур (одновременному присутствию вегетативных и покоящихся клеток различной морфологии и ультраструктуры).

Наиболее активными по деструкции парафинов или нефти препаратами (в жидких средах или почвенных микрокосмах) были культуры на основе геля из СПГВ, гуматов, ПФ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-18-29-05009) и частичной поддержке Минобрнауки РФ (Госзадания для ФИЦ Биотехнологии РАН).

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЯЕМОЙ ОТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Новикова О.Б.^{1,}, Ладанова М.А.²*

¹Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Санкт-Петербург – Ломоносов

²Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины,
Санкт-Петербург, ldnvmr@mail.ru
*ksuvet@mail.ru

Введение. Существенным звеном оптимизации экономических показателей птицеводства является создание стабильной эпизоотической ситуации в отношении инфекционных, в частности, бактериальных болезней птиц, наносящих значительный экономический ущерб. В связи с этим изучение спектра микроорганизмов, циркулирующих на птицефабриках, является объективной необходимостью.

Материалы и методы. Нами изучено биоразнообразие патогенной микрофлоры, выделяемой от сельскохозяйственной птицы разных видов в промышленных, а также фермерских птицеводствах 43 регионов РФ (всех восьми ФО), Беларуси, Казахстана, Таджикистана, Узбекистана. Проведено бакисследование павших и вынужденно убитых цыплят и кур яйценоских, бройлеров, индеек, перепелов, гусей и уток разного возраста, мазков из трахеи, помета, эмбрионов, отходов инкубации, воздуха выводных шкафов инкубатория и других

помещений, смывов с оборудования в 119-ти птицеводческих хозяйствах, из них 40 – по производству яйца, 51 – бройлерных, 8 – индейководческих, 7 – перепелиных, 13 – гусеводческих. Всего было сделано 3497 высевов от 1158 трупов, выделено 4019 культур более 30 видов патогенных микроорганизмов.

Результаты и обсуждение. При изучении биоразнообразия патогенной микрофлоры установлено, что спектр микроорганизмов, циркулирующих на птицефабриках, достаточно широк и включает более 30 видов. Ведущее место занимает кишечная палочка *E.coli*, ее удельный вес в спектре выделенной микрофлоры составляет 45,1 %. Значительный процент приходится на кокковую микрофлору: 21,8 % – стафилококки и 5,4 % – энтерококки. Из стафилококков чаще выделяли *St.aureus*, *St.epidermidis* и *St.citreus*. Из энтерококков – *E.faecalis*, *E.faecium*. Доля энтеробактерий составила 2,5 % (кроме протеев и сальмонелл). Из семейства *Enterobacteriaceae* доминирующими были культуры родов *Citrobacter* (в т. ч. *C.freundii*, *C.diversus*, *C.amalonicus*), *Klebsiella*. Также встречались энтеробактерии родов *Enterobacter* (*E.aerogenes*, *E.agglomerans*, *E.cloacae*), *Providencia*, *Serratia*. Отдельно мы выделили протей (*P.vulgaris* и *P.mirabilis*) – 14,2 %. В 3,8 % случаев выделены культуры эпидемиологически опасных сальмонелл, чаще серотипов *S.Enteritidis*, *S.Typhimurium*, *S.Gallinarum* и *S.Infantis*. В 4,2 % выделены культуры клостридий, в большинстве – *Cl.perfringens*. В 1,5 % случаев выделены культуры *P.aeruginosa*. Небольшой процент пришелся на респираторную микрофлору – 0,5 %. Из респираторных микроорганизмов выделены *P.multocida*, *O.rhinotracheale*, *G.anatis*, *Corynebacterium spp.* Кроме бактериальной микрофлоры в некоторых хозяйствах выделяли возбудителей грибковых болезней – родов *Aspergillus* и *Candida* (0,4 %). В наименьшем проценте выделены микроорганизмы родов *Micrococcus spp.* (0,2 %) и *Bacillus spp.* (0,1 %). Из рода *Bacillus* чаще выделяли гемолитические *B.cereus*. На некоторых птицефабриках (от всех видов птиц) выделяли культуры кампилобактерий вида *C.jejuni*, реже *C.coli*. Также в некоторых пробах был обнаружен близкородственный кампилобактериям микроорганизм *Arcobacter cryaerophilus*.

Выводы. Видовой состав выделяемой микрофлоры обусловлен эпизоотической ситуацией в каждом отдельном хозяйстве. Во всех случаях отмечали развитие смешанных инфекций (в т. ч. с вирусными и паразитарными болезнями), ассоциативное воздействие разных видов микроорганизмов на организм птицы.

ТИРОЗОЛ АКТИВИРУЕТ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Носкова Е. В.^{1,*}, Кнорре Д. А.^{1,2}, Галкина К. В.^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

*chemistrykekulen@gmail.com, 8-919-526-09-71

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – это низкая восприимчивость клеток к воздействию чужеродных соединений. МЛУ патогенных видов микроорганизмов – серьезная медицинская проблема, снижающая эффективность действия клинических препаратов. Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным объектом для исследования механизмов МЛУ патогенных грибов. В основе системы МЛУ у них лежит работа неспецифических АВС-переносчиков: Pdr5, Snq2 и Yor1.

Мы предположили, что накопление в клетке токсинов, вызывающих активацию МЛУ, может приводить к выбросу АВС-переносчиками некоторых собственных вторичных метаболитов. В этом случае данные вторичные метаболиты могли бы выступать в качестве “сигнала тревоги”, сообщая об активации МЛУ в клетках, находящихся в той же суспензии. Чтобы проверить свое предположение, мы исследовали воздействие вторичных метаболитов – продуктов деградации ароматических аминокислот: триптофола, фенилэтанола-2 и тирозола на активность системы МЛУ в клетках дрожжей. В отличие от триптофола и фенилэтанола-2,

тирозол значительно снижал скорость роста клеток в штамме с нарушением работы МЛУ по сравнению с контролем. Это указывает на то, что тирозол может быть субстратом АВС-переносчиков.

Мы обнаружили, что репрессия генов *PDR5* и *SNQ2*, но не *YOR1* снижала устойчивость клеток к тирозолу. Однако, сверхэкспрессия этих генов не увеличивала выживаемость клеток при добавлении тирозола. Методом проточной цитофлюориметрии и флюоресцентной микроскопии мы показали, что тирозол вызывает увеличение количества переносчика Ppdr5, тегированного GFP.

Анализ накопления в клетках субстрата АВС-переносчиков Нильского красного показал отсутствие конкурентного ингибирования между данным субстратом и тирозолом. При этом прединкубация клеток с тирозолом приводила к активации в них МЛУ и снижала количество Нильского красного.

Таким образом, тирозол является активатором МЛУ в клетках дрожжей, токсичен для штаммов с репрессированными АВС-переносчиками с широкой субстратной специфичностью, но не является их субстратом. Наши данные показывают, что дрожжи способны регулировать работу МЛУ на межклеточном уровне с помощью собственного вторичного метаболита – тирозола.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *L. FERMENTUM* HFD1

Ожегов Г. Д., М. Наит Яхиа, Каюмов А. Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
georgii_provisor@mail.ru

Введение. Антибактериальная активность метаболитов молочнокислых бактерий давно известна и широко используется как в пищевой промышленности, так и в медицине. Помимо неспецифичных метаболитов, таких как пероксид водорода или короткоцепочечные жирные кислоты, инструментами антагонистической активности являются и специализированные антибактериальные пептиды бактерий – бактериоцины.

Целью работы является выделение и очистка бактериоцинов из нового штамма *L. Fermentum* HFD1, выделенного из фекалий здоровой женщины.

Материалы и методы. Бесклеточную культуральную жидкость (БКЖ) получали центрифугированием 48-часовой культуры *L. Fermentum* HFD1, предварительно доведя рН до 2,0. Для получения суммы пептидной фракций из БКЖ использовали твёрдофазную экстракцию на картридже с сорбентом С18. Элюцию проводили ступенчато растворами ацетонитрила 25, 50 и 80 %. Дальнейшую очистку проводили методом ВЭЖХ на полупрепаративной колонке С18 250x10 мм в градиенте растворителей 0,01 % раствор трифторуксусной кислоты в воде-ацетонитрил со скоростью потока 2мл/мин. Активность проверяли «спот-тестом» в отношении тест-штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Результаты. Наибольшую активность проявляла фракция веществ, элюированная с картриджа 25% ацетонитрилом и её использовали для дальнейшей очистки. В ходе полупрепаративной хроматографии обнаружено, что группа пиков с временем удерживания от 5 до 7 минут обладает наибольшей активностью.

Заключение. Были выделены и частично очищены антибактериальные соединения из штамма *L. Fermentum* HFD1, активные в отношении *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Частичная очистка полупрепаративной ВЭЖХ не позволило получить индивидуальные бактериоцины, поэтому необходимы дальнейшие эксперименты по их очистке.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (MD572.2020.4).

ДЕЛЕЦИИ ГЛОБАЛЬНЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ВЛИЯЮТ НА РЕДОКС-СТАТУС И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ В РАСТУЩИХ И ГОЛОДАЮЩИХ КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI*

Октябрьский О. Н.*, Смирнова Г. В., Тюленев А. В., Музыка Н. Г.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский федеральный исследовательский центр, Пермь
*oktyabr@iegm.ru

Многие из метаболических перестроек, ведущих к толерантности и персистенции, связаны с переходом к дормантному состоянию, характеризующемуся резким замедлением метаболических процессов, которое контролируется сигнальными путями, включенными в строгий ответ с участием (p)ppGpp, общий стрессовый ответ или SOS-ответ. Среди сигнальных путей важное место занимает редокс-сигнализация. Целью данной работы было выявление связи между изменениями редокс-статуса клеток и активностью глобальных транскрипционных регуляторов (ppGpp, RpoS и RecA) и их роли в формировании толерантности к антибиотикам в растущих и голодающих по фосфату (Pi) культурах *E. coli*. Объектом исследований служили родитель (wt) и нокаут мутанты *relA*, *rpoS* и *recA* из коллекции Keio с удаленной каскадой устойчивости к канамицину. Бактерии выращивали на среде MOPS с глюкозой и фосфатом в 250-мл колбах на качалках (150 об/мин) при температуре 37 °С. В экспериментах с голоданием растущую культуру центрифугировали и переносили в среду MOPS с глюкозой без Pi. Для характеристики редокс-статуса клеток определяли восстановленный (GSH) и окисленный (GSSG) глутатион, соотношение NAD/NADH, продукцию АТФ, супероксид и H₂O₂. Чувствительность к канамицину (Кан, 30 мкг/мл), ципрофлоксацину (ЦФ, 3 мкг/мл) и цефотаксиму (Цеф, 10 мкг/мл) изучали, определяя изменения мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и способность бактерий к образованию колоний (КОЕ).

В растущей культуре мутация *relA* не влияла на уровень внутриклеточного глутатиона (GSH_{in}), мутация *recA* снижала этот уровень в 2,3 раза, а *rpoS* – повышала в 1,3 раза относительно родителя. При этом *recA* и *rpoS* мутанты имели в 5,5 и 2 раза более высокий уровень GSH_{out} в среде. Мутации *relA* и *rpoS* в 2,8 и 2,2 раза снижали соотношение NAD/NADH. Все мутации не влияли на уровень АТФ, скорость продукции супероксида и накопление H₂O₂ в среде. Переход от роста к голоданию во всех штаммах приводил к резкому падению уровня АТФ, замедлению роста, повышению GSH_{in} и снижению GSH_{out} и H₂O₂. Наблюдалась продукция H₂S, менее интенсивная у *rpoS*.

При действии ЦФ на растущие культуры мутации *relA* и *rpoS* снижали КОЕ в 5-10 раз по сравнению с родителем в течение 4 часов экспозиции. В *recA* мутанте КОЕ падало до 0 уже через 2 часа экспозиции. Напротив, *recA* мутант был на 2 порядка устойчивее родителя при обработке Цеф. При действии Кан в течение 4 часов более высокую чувствительность проявлял *rpoS*. Через 24 часа воздействия ЦФ число персистеров равнялось 0 у мутанта *recA*. У всех мутантов наблюдалось резкое снижение устойчивости к Кан. При действии Цеф на *recA* мутант количество персистеров возрастало в 7 раз по сравнению с wt. Интересно, что мутация *recA* способствовала сохранению $\Delta\psi$ при действии ЦФ и Цеф, но вызывала его резкое снижение по сравнению с родителем при обработке Кан. В культуре, голодающей по Pi, мутации *recA* и *rpoS* резко замедляли развитие толерантности к ЦФ и Кан соответственно. Таким образом, делеции генов *relA*, *recA* и *rpoS* приводят к существенным нарушениям редокс-статуса клеток *E. coli*, что может вносить вклад в их влияние на устойчивость бактерий к действию антибиотиков.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием ААА-А-А19-119112290009-1 и поддержана грантами РФФИ № 19-04-00888 и Президента РФ № МК-420.2020.4.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ КАК КОММУНИКАТИВНЫХ АГЕНТОВ НА РЕГУЛЯЦИЮ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ С УЧАСТИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Олескин А. В.¹, Постнов А. Л.¹, Цао Боянг²

¹Кафедра общей экологии и гидробиологии, биологический ф-т МГУ

²Кафедра природопользования, Совместный ун-т МГУ-ППИ (Шэньчжэнь, Китай)

Одной из центральных философских проблем современной экологии (и том числе, и в применении к экосистемам водоёмов) является проблема стабильного, гармоничного функционирования многих природных экосистем в отсутствие центрального управляющего звена. Каким образом получается так, что существует множество долговременно устойчивых климатических экосистем, которые существенно не менялись и функционировали на протяжении многих миллионов лет?

Значительную популярность в современной науке имеет междисциплинарное понятие *децентрализованная сетевая структура*. Оно приложимо именно тогда, когда система координировано действует и при этом не имеет единого управляющего центра. В сетевой структуре сложным образом кооперируют и в то же время конкурируют между собой много сосуществующих взаимодействующих центров активности. В применении к экосистемам в природе речь может идти о взаимодействии многих их звеньев – популяций или ассоциаций живых организмов, которые вырабатывают химические сигналы, воспринимаемые другими представителями той же экосистемы и оказывающие на них многообразное регуляторное влияние в ролях феромонов, алломонов, кайромонов, синомонов и др.

Следует ожидать, что подобные межвидовые коммуникативные сигналы имеют разнообразную химическую природу: это могут быть различные органические молекулы, ионы, неорганические (в том числе газообразные) вещества. В настоящей работе рассмотрим одну из функциональных групп химических агентов, регулирующих функционирование экосистем. Речь идет о *нейромедиаторах (нейротрансмиттерах)* – веществах, которые переносят информацию в форме импульсов между нервными клетками (нейронами) или от нейрона к исполняющей команду мышечной клетке или клетке железы. Нейромедиаторы подразделяют на несколько групп: 1) биогенные амины, в том числе катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин), серотонин, гистамин и др.; 2) аминокислоты (аспарагиновая, глутаминовая, гамма-аминомасляная кислота, глицин и др.); 3) пептиды – эндорфины, энкефалины, динорфины, вещество P и др.; 4) «газообразные нейромедиаторы» (газотрансмиттеры) окись азота, окись углерода, сероводород и другие вещества, находящиеся в газообразном состоянии при комнатной температуре и атмосферном давлении 5) пурины (например, аденозин, АТФ). В данной работе не будем касаться терминологических различий между передающими нервные импульсы через синаптическую щель нейромедиаторами и *нейромодуляторами*, которые модулируют эффекты нейромедиаторов, и используем понятие «нейромедиатор» как обобщающее понятие, тем более что многие химические агенты, например, норадреналин сочетают обе функциональные роли.

Многие нейромедиаторы обладают полифункциональностью, сочетая роли нейромедиаторов, гормонов, местных тканевых факторов (гистогормонов). Ряд нейромедиаторов выполняют коммуникативные и регуляторные функции у представителей различных типов животных, растений), грибов, простейших, что позволяет обозначать их более общим термином биомедиаторы. «Нейротрансмиттеры – мультифункциональные вещества, участвующие в процессе развития микроорганизмов, растений, животных».

Для данной работы особо отметим, что подобные биомедиаторы участвуют во всякого рода межвидовых взаимодействиях, и тогда они вовлечены в регулирование функционирования целых консорциумов или экосистем. В качестве вводного примера: упомянутые выше катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин) оказывают стимулирующее действие на рост различных живущих в кишечнике человека патогенных, оппортунистических и сапротрофных бактерий. Поскольку указанные катехоламины вырабатываются организмом-хозяином при стрессе в повышенных количествах, получается, что микробные симбионты или

паразиты «заинтересованы» в стрессированном состоянии хозяина; аналогичные явления характерны и для водных экосистем¹.

В настоящей работе выдвигается предположение о роли нейромедиаторов в составе пула экосистемных сигналов, которые вырабатываются и воспринимаются сразу многими компонентами экосистем и поэтому служат для коммуникации не только в рамках парных взаимодействий паразит-хозяин или хищник-жертва, но и на более «глобальном» уровне регуляции функционирования всей экосистемы. К сожалению, все существующие термины «заточены» на внутривидовые (феромоны) или межвидовые, но тогда парные (алломоны, кайромоны, синомоны) взаимодействия. Может быть, следовало бы ввести новый термин *экомоны* для описания характерного для ряда сигнальных веществ, в том числе некоторых нейромедиаторов, взаимодействия на уровне сразу многих компонентов экосистемы. Предложение о роли нейромедиаторов как регуляторов экосистемного уровня, высказываемое в данной работе, является гипотетическим. Однако оно согласуется с рядом приводимых ниже фактов.

В первую очередь, эти факты касаются почти универсального распространения нейромедиаторов (биомедиаторов в понимании В.В. Рожиной, Roschina, 2010) у различных населяющих водоемы организмов – от бактерий до рыб, от грибов до цветковых растений, причем у тех видов живого, где проведен детальный анализ роли нейромедиаторов, в типичном случае выясняется *двунаправленность* их действия – они производятся (выделяются) тем или иным организмом и в то же время действуют на него, благодаря наличию у организма специфических связывающих участков, рецепторов.

Нейромедиаторы у микроорганизмов. Синтез нейроактивных соединений микроорганизмами рассматривается как составная часть *микробной эндокринологии* (Lyte, 2016). Можно сказать, что микробная эндокринология включает в себя все теории, в рамках которых нейрохимические агенты, образуемые как многоклеточными организмами, так и микроорганизмами (например, серотонин, глутамовая и -аминомасляная кислота) рассматриваются как «общий универсальный язык», обеспечивающий коммуникацию между представителями различных царств и империй живого.

В частности, как уже было отмечено, в литературе накоплен значительный массив данных о стимулирующем эффекте катехоламинов на рост различных микроорганизмов. Впрочем, эффекты катехоламинов варьировали в зависимости от концентрации и таксономической принадлежности тестируемых микроорганизмов. Дофамин существенно стимулировал пролиферацию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, напротив, норадреналин был малоэффективен. Дофамин и норадреналин, добавленные в плотную питательную среду, различались по своему эффекту на образование микроколоний *E. coli* K-12: норадреналин стимулировал этот процесс, а дофамин ингибировал его (авторские данные).

Диалог в экосистеме, осуществляемый с помощью катехоламинов, имеет двунаправленный характер, поскольку микроорганизмы не только реагируют на них, но и сами активно продуцируют эту группу биогенных аминов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с амперометрической детекцией было количественно определено содержание катехоламинов в культурах многих про- и эукариотических микроорганизмов (Цавкелова и др., 2000). Например, норадреналин в концентрациях 0,2–2 мкМ присутствовал в биомассе *B. mycoides*, *B. subtilis*, *P. vulgaris* и *S. marcescens*; дофамин в количестве 0,5–2 мкМ – в биомассе большинства протестированных прокариот.

С точки зрения «водной экологии» интересно, что дофамин в микромолярных концентрациях детектирован также у *M. morgani* (2,46 мг/л, ~16 мкМ), *K. pneumonia* (1,06 мг/л; 6,9 мкМ) и *H. alvei* (0,73 мг/л; 4,7 мкМ), изолированных из рыбных продуктов (Özogul, 2004). У большинства протестированных микроорганизмов обнаружен также продукт окислительного дезаминирования дофамина – дигидрофенилуксусная кислота (ДФУК) (Цавкелова и др., 2000). У *Saccharomyces cerevisiae* и *Penicillium chrysogenum* обнаружили достаточно высокие концентрации норадреналина: 0,21 мкМ и 21,1 мкМ, соответственно (Цавкелова и др., 2000). У *B. subtilis* норадреналин и дофамин присутствовали, в основном, не внутриклеточно, а снаружи клеточной стенки. В свете предположения о коммуникативной функции нейротрансмиттеров они, возможно, служат информационными молекулами ограниченного радиуса действия не только у животных (где они передают информацию от нейрона к нейрону), но и у прокариот.

¹ Кишку можно рассматривать как миниводоем с «водной микроэкосистемой»

Способность к синтезу гистамина с выделением в среду культивирования установлена для широкого спектра бактерий (обзоры: Oleskin, Shenderov, 2020; Олескин и др., 2020).

Нейромедиаторы у представителей фитопланктона. Нейромедиаторы серотонин, гистамин, дофамин (Oleskin et al., 2021), норадреналин (неопубликованные данные автора), стимулируют (в различной степени) рост зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*. Учитывая неопубликованные данные автора, что сами клетки этой водоросли не содержат серотонина, дофамина, норадреналина, можно предположить, что она «рассчитывает» на выработку соответствующих нейромедиаторов другими представителями природных экосистем. В частности, они выделяются в среду различными беспозвоночными — представителями зоопланктона (Грицай, 2017). Поскольку дофамин и норадреналин выступают как вещества стресса, а гистамин и серотонин выделяются при всякого рода травмах и воспалительных процессах, получается известная «заинтересованность» зеленой водоросли в травмировании и стрессировании водных животных.

В отличие от хлореллы (лишенной по крайней мере катехоламинов и серотонина, по нашим неопубликованным данным), многие другие виды водорослей (представители *Chlorophyta*, *Charophyta*, *Ochrophyta*, *Rhodophyta*) синтезируют значительные количества дофамина, серотонина, гистамина, тирамина и/или ацетилхолина. По крайней мере у зеленой водоросли *Ulvaria obscura* дофамин, который накапливается в ее биомассе в количестве, соответствующем 4.4% веса биомассы, функционирует как кайромон -- протектор жертвы (водоросли) (Остроумов, 1986), предотвращая поедание этой водоросли морскими ежами, брюхоногими, а также членистоногими (Van Alstyne et al., 2014).

Нейромедиаторы у водных беспозвоночных. Нейротрансмиттеры участвуют в регуляции различных физиологических процессов у представителей зоопланктона. Так, ацетилхолин выступает как ингибитор процесса конъюгации у инфузорий *Paramecium*. У этих одноклеточных организмах было установлено наличие функционально связанных никотиновых и мускариновых рецепторов и расщепляющего ацетилхолин фермента ацетилхолинэстеразы. Холинацетилтрансфераза, катализирующая синтез ацетилхолина, локализована на поверхностной мембране компетентных клеток *Paramecium primaurelia* (Roschina, 2010). Дофамин накапливается в клетках инфузории *Tetrahymena pyriformis* (Roschina, 2010).

Есть факты, позволяющие говорить о вовлеченности нейромедиаторов в пищевые взаимодействия водных беспозвоночных как хищников и водорослей как их жертв, т.е. об их возможной функции в качестве кайромонов (Остроумов, 1986). Нейроактивные вещества, попадающие в окружающую среду как поллютанты. В частности, такие поллютанты вызывают нейрохимические изменения в организмах водных беспозвоночных. Достаточно сказать, что известный наркотик морфин (агонист пептидных нейромедиаторов эндорфинов) снижает уровень серотонина и повышает уровень дофамина в организме моллюска *Elliptio complanata*, что на поведенческом уровне проявляется расслабленным состоянием моллюска.. Нарушающий функционирование катехоламинов в нервной системе метамфетамин, попадая в водную среду, влияет на долговременную память улитки *Limnaea stagnalis* (Rosi-Marchall et al., 2015).

Разумеется, нейромедиаторы следует рассматривать наряду с другими химическими агентами, также «обслуживающими» межвидовые взаимодействия, в том числе и трофические. Дафнии питаются также водорослями рода *Scenedesmus*, причем выделяемая дафниями в среду мочевины индуцирует формирование компактных групп клеток (ценнобиев) у *Scenedesmus subspicatum* (Wiltshire, Lampert 1999). В литературе предполагалась защитная роль такой агрегации клеток, которая затрудняет их поедание дафниями, т.е. допускалась роль мочевины в рамках одного из подклассов кайромонов, а именно уже упомянутая роль протектора жертвы (Остроумов, 1986). Однако крупные дафнии, к числу которых принадлежит объект цитированной работы (Wiltshire, Lampert, 1999) – *D. magna*, беспрепятственно поедают и большие клеточные агрегаты. Можно предположить, что в данном случае роль мочевины, выделенной дафниями, соответствует интересам хищника (как и указанная выше стимуляция роста водорослей): мочевины компактизует расположение клеток водоросли-жертвы и облегчает тем самым поиск и быстрое потребление пищи дафниями. В этом контексте упомянем и авторские неопубликованные данные о том, что нейромедиаторы меняют расположение клеток хлореллы, вызывая формирование агрегатов у ней, что также должно ускорять ее поедание достаточно крупным хищником типа *Daphnia magna*.

МОНИТОРИНГ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ГОСПИТАЛЬНОЙ СРЕДЫ РОДОВСПОМОГАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ Г. МАХАЧКАЛА

Омарова С. М., Багандова Д. Ш., Ахмедова Р. С., Исаева Р. И., Саидова П. С.

Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Республика Дагестан, Махачкала, dgma@list.ru

Введение. Интерес к ситуации с внутрибольничными инфекциями не ослабевает во всем мире, несмотря на предпринимаемые меры борьбы и профилактики с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. По данным ВОЗ показатель летальности у больных, находящихся в стационарах различного профиля, на фоне развившихся ВБИ увеличивается в десятки раз. Стационарами риска по развитию ВБИ традиционно являются хирургические и родовспомогательные учреждения.

Целью исследования явилось изучение микробного пейзажа внешней среды отделений родовспомогательного стационара г. Махачкала в рамках эпидемиологического надзора за ВБИ и мониторинга обсемененности стационара условно-патогенными микроорганизмами (УПМ).

Материалы и методы. Бактериологическое исследование осуществляли в соответствии с приказом Минздрава №691 от 28.12.1989 «О профилактике ВБИ в акушерском стационаре» и приказом №345 МЗ РФ от 26.11.1997 «О совершенствовании мероприятий по профилактике ВБИ в акушерских стационарах».

Результаты и их обсуждение. Исследование сухих и влажных поверхностей внешней среды родильного стационара показало, что из 550 изученных образцов положительный результат дали 367 бактериологических посева. Процент положительных находок с сухих поверхностей составил 74,2 % и 25,8 % — с влажных объектов. С сухих поверхностей грамположительная микробиота обнаруживалась чаще, чем грамотрицательная, процент положительных находок составил 63,1 % и 31,5 % соответственно, на грибы приходилось 4,0 %. Частота положительных посевов с влажных поверхностей составила 25,8 %, из которых в 53,1 % случаях выделялась грамотрицательная микрофлора, а грамположительные бактерии выделялись в 46,8 % случаев.

Достоверно чаще из смывов с оборудования выделялись культуры *S. epidermidis* 18,5 % и *S. saprophyticus* 17,7 %. Из них 78,1 % культур относились к некоагулирующим плазму (КО) видам. Из плазмокоагулирующих (КП) видов выделяли *S. aureus*, которые обладали и другими факторами патогенности - лецитиназу продуцировали 47,3 % штамма, гемолизины — 19,6 %, ДНК-азу — 23,1 %. Не все культуры, относящиеся к КП видам, в том числе и *S. aureus*, вызывали коагуляцию плазмы. КО стафилококкам в 11,4 % и 13,9 % соответственно, обладали лецитиназной и ДНК-азной активностью, гемолизины выделяли — 20,9 % штаммов. От 23 сотрудников, обследованных дважды, с интервалом 6 месяцев всего было выделено 36 культур стафилококков. Чаще всего стафилококки высевали из смывов верхних дыхательных путей медсестер. В 24,1 % это были *S. aureus*, что значительно выше показателя обсемененности золотистыми стафилококками объектов внешней среды ($p < 0,05$). КП стафилококки составляли 39,8 %, что существенно больше, чем во внешней среде ($p < 0,05$). Из них 61,9 % культур обладали лецитиназой, 43,8 % — гемолизинами, что выше ($p < 0,05$) аналогичных показателей во внешней среде, 28,4 % — ДНК-азой. Из КО стафилококкам лецитиназу продуцировали 11,9 %, гемолизины — 4,8 %, ДНК-азу — 3,3 % штаммов.

Выводы. Таким образом, проведенный микробиологический мониторинг санитарного состояния отделений родовспомогательного учреждения г. Махачкала, в целях эпидемиологического надзора за распространением возбудителей ВБИ показал, что изучение образцов с объектов внешней среды выявили качественное и количественное разнообразие бактериальной микрофлоры с преимущественным выделением грамположительных бактерий. Важным звеном является передача госпитальных штаммов через бактерионосителей и персонал стационара.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СЕКРЕТИРУЕМОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ У *TALAROMYCES CELLULOLYTICUS*

Орленева А. П.^{*}, Серебряный В. А., Кутукова Е. А., Ямпольская Т. А.

Акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»
Москва

*Alexandra_Orleneva@agri.ru

Talaromyces cellulolyticus Y-94, мицелиальный гриб, ранее известный как *Acremonium cellulolyticus*, в настоящее время интенсивно изучается как микроорганизм, способный эффективно перерабатывать различные лигноцеллюлозные субстраты в моносахариды.

Дальнейшие исследования *T. cellulolyticus* и разработка новых штаммов на основе этого гриба зависят от наличия широкого спектра генетических инструментов. В частности, наличие гена, кодирующего белок с удобно измеряемой активностью, облегчило бы изучение регуляции экспрессии генов и поиск новых активных промоторов. В качестве такого удобного белка часто используется секретируемая β -галактозидаза (β -Gal).

У *T. cellulolyticus* не удалось обнаружить существенную β -Gal активность при культивировании на различных минимальных и полноценных средах. Несмотря на это, ген *lacA*, кодирующий ортолог грибных внеклеточных β -Gal, принадлежащих к семейству гликозил-гидролаз 35, был найден в геноме *T. cellulolyticus* (TCEO_017f03666) с помощью BLAST. Замена нативного промотора *lacA* на сильный конститутивный промотор гена *tef1* привела к появлению существенной β -Gal активности у штаммов *T. cellulolyticus* при росте, как на минимальной, так и на богатой среде. Для найденного фермента были определены оптимумы температуры и pH; они оказались близки к соответствующим характеристикам β -Gal других мицелиальных грибов.

Несмотря на структурную близость β -Gal *T. cellulolyticus* ферментам грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, область соответствующая сигнальному пептиду у этого белка заканчивается неканонической последовательностью «QR». Замена этой последовательности на каноническую «KR», не повлияла на уровень активности фермента и его свойства.

Выводы: У *T. cellulolyticus* найден ген *lacA*, кодирующий функциональную β -Gal (белок TCEO_017f03666), экспрессия которого не осуществляется в достаточной мере при стандартных условиях культивирования. Этот факт позволяет использовать *lacA* для генетических исследований *T. cellulolyticus*, например, для изучения регуляции экспрессии генов в разных условиях или поиска новых активных промоторов.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ АКТИНОБАКТЕРИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАСТЕНИЯМИ, ПОРАЖЁННЫМИ МИНИРУЮЩИМИ НАСЕКОМЫМИ И ГАЛЛООБРАЗУЮЩИМИ КЛЕЩАМИ

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

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
adm@ibpm.ru

²Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН,
admin@sevin.ru

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии исследовано 818 штаммов, выделенных из пораженных насекомыми-минерами и клещами растений, собранных на территории Москвы и Московской области в 2020-21 гг.

Микробные сообщества растений, пораженных фитопаразитическими членистоногими, на сегодняшний день весьма слабо изучены. Настоящее исследование может представлять интерес для специалистов в области экологии, защиты растений и поиска штаммов,

перспективных для биотехнологии. Целью работы являлось создание коллекции штаммов, выделенных из растений, поражённых минёрами и клещами, и их первичный таксономический анализ.

Были исследованы образцы черёмухи обыкновенной (*Prunus padus*), осота розового (*Cirsium arvense*), полыни (*Artemisia sp.*), конского каштана (*Aesculus sp.*), ивы (*Salix sp.*), и представителей семейства зонтичных (*Umbelliferae*), поражённые минирующими насекомыми, а также липы (*Tilia sp.*), поражённой галлообразующими клещами. Для анализа здоровые (контроль) и поражённые участки листа площадью 1 см² или отдельные галлы отмывали в дистиллированной воде в течение 30 минут с использованием шейкера. Исходный и обработанный 90 % раствором этилового спирта в течение 30 секунд растительный материал гомогенизировали в ступке с добавлением 1 мл физ. раствора; суспензию переносили на питательную среду R2A (Fluka) и втирали при помощи шпателя. Посевы культивировали при температуре 24-26 °С до 20 дней.

Около половины выделенных изолятов были идентифицированы с использованием базы данных производителя (Bruker) и локальной базы данных «ВКМ-МАЛДИ», включающей масс-спектры типовых штаммов бактерий ряда семейств и практически-значимых групп (фитопатогены, молочнокислые бактерии и др.), слабо представленных в базе данных Bruker. Среди идентифицированных штаммов обнаружены (от общего количества колоний из высевов разных образцов на чашках): представители *Rathayibacter* (образцы липы, до 14,5 %; осота, 3,8 %; к. каштана, 17,4 %; зонтичных, 20 %), *Curtobacterium* (осот, 3,8 %; к. каштан, 13,3 %), *Clavibacter* (липа, 7,3 %; к. каштан, 1,7 %; ива, 14,3 %; зонтичных, 4,0 %), *Plantibacter* (липа, 1,8 %; осот, 30,8 %), *Frigoribacterium* (липа, 32,1 %; к. каштан, 1,7 %; зонтичные, 4,5 %; ива, 7,7 %), *Agreia* (3,6 % из образцов липы). В ряде случаев доля бактерий разных родов в сообществах культивируемых микроорганизмов была значительно выше, чем известно из литературных источников по описанию эндофитной микробиоты здоровых растений. Определены также штаммы родов *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, и *Sphingomonas*. Среди идентифицированных штаммов выявлен ряд новых видов актинобактерий.

МЕТАНОГЕННЫЕ АРХЕИ – МОДЕЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ КОСМИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Ошуркова В. И.^{1,*}, Пономарева А. Л.², Щербакова В. А.¹

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, adm@ibpm.ru

²Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичёва Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, pacific@poi.dvo.ru

*oshurkova.viktoriya@gmail.com

Метаногены — одни из простейших и древнейших организмов на Земле, которые метаболизуют простые субстраты — водород и окись углерода — в бескислородных условиях. Некоторые из них являются экстремофилами, поэтому вызывают интерес для изучения в качестве модельных объектов астробиологии. Одной из тенденций, связанной с защитой окружающей среды и поиском альтернативных источников энергии, является использование метаноархей в качестве переносчиков электронов в микробных топливных элементах (МТЭ). Целью настоящей работы является подбор метаногена для испытаний в качестве электрогенного микроорганизма для функционирования МТЭ в условиях космоса.

Предварительные испытания показали, что из пяти исследуемых штаммов метаногенов родов *Methanosarcina* и *Methanobacterium* наиболее устойчивым к воздействию УФ-облучения (166.4 Дж/см²) и вакуумирования (10⁻⁵ атм) оказался *Methanosarcina mazei* S-6^T. Кроме того, штамм S-6^T экспонировался в течение 24 месяцев на поверхности Международной космической станции, после чего была обнаружена жизнеспособная популяция клеток штамма (Ошуркова и др. 2021). Анализ ультратонких срезов показал, что штамм, вероятно, способен формировать сложноорганизованные многослойные покровы в условиях длительного пре-

бывания в открытом космосе, что может свидетельствовать о переходе клеток в состояние очень глубокого покоя. Штамм JL01 *M. mazei*, выделенный из вечной мерзлоты Арктики, оказался устойчив к воздействию сверхвысоких доз УФ (суммарная доза 6,06 кДж/см²) и после облучения продуцировал метан до контрольных значений. Эта метаноархея была выделена из устойчивой бинарной культуры с сахаролитической бактерией *Sphaerochaeta associata* GLS2^T. В стрессовых условиях для получения энергетической выгоды эти микроорганизмы вступают в синтрофные взаимодействия, где способны поддерживать парциальное давление водорода на уровне 10⁻⁴–10⁻⁵ атм, что дает больше энергии на моль сброженной гексозы. Способность сферохеты использовать для роста полисахариды клеточных стенок метаноархеи и продуцировать ацетат для метаногенеза была подтверждена экспериментально.

Таким образом, опираясь на проведенные эксперименты, демонстрирующие свойства метаноархей переносить жесткие условия, характерные для космического пространства, мы планируем использовать *M. mazei*S-6^T, а также синтрофную ассоциацию *M. JL01* и *S. associata* GLS2^T в проекте «Спутник» ДФУ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00831.

ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ, И НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛОВ: ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ НА БАКТЕРИИ

Падий Д. А.^{1,2,*}, Веселова В. О.³, Костров А. Н.⁴, Втюрина Д. Н.⁴,
Плюта В. А.¹, Хмель И. А.¹

¹НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва, img@img.ras.ru

²РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва, pochta@muctr.ru

³ИОНХ РАН, Москва, info@igic.ras.ru

⁴ФИЦ ХФ РАН, Москва, icp@chph.ras.ru

*padydarya@gmail.com

Проблема широкого распространения устойчивости бактерий к антибактериальным агентам является крайне существенной для медицины. Это свидетельствует о необходимости усовершенствования существующих методов борьбы с патогенами и/или разработки новых. Антибактериальными свойствами обладает множество различных соединений. Большой интерес в настоящее время вызывает антибактериальное действие наночастиц металлов и летучих органических соединений (ЛОС), синтезируемых микроорганизмами.

Целью данной работы являлось исследование выживаемости бактериальных клеток при действии индивидуальных ЛОС (диметилдисульфида, изоамилового спирта, 2-фенилэтанол, 2-октанона, β-ионона, лимонена и α-пинена) совместно с наночастицами серебра (НЧС), а также изучение антибактериальных свойств тканевых наноструктурированных поверхностей (НСП) с наночастицами оксидов металлов (CuO, ZnO + TiO₂, ZnO + ПАВ (поверхностно-активное вещество цетилтриметиламмоний бромид)). Для исследования совместного действия ЛОС и НЧС проводили культивирование бактерий в жидкой питательной среде в присутствии ЛОС, НЧС и ЛОС + НЧС. Для изучения антибактериального эффекта НСП использовали разные методы: культивирование бактерий с НСП на твердой и в жидкой питательных средах, а также методика, описанная в ГОСТ Р ИСО 20743-2012.

Было показано, что при совместном действии ЛОС и НЧС на рост бактерии *Escherichia coli* наблюдалось усиление их антибактериальной активности (аддитивный или синергидный эффект). При исследовании действия НСП на рост бактерий на твердой питательной среде был отмечен антибактериальный эффект для текстиля с наночастицами (ZnO +TiO₂) и ZnO с ПАВ. НСП с CuO не ингибировали рост микроорганизмов. В жидкой питательной среде ни одна из исследованных НСП не ингибировала рост *E. coli* и *Chromobacterium violaceum*. Более того, было отмечено стимулирование роста *C. violaceum* при действии НСП, содержащих наночастицы ZnO. При оценке антибактериального эффекта НСП согласно ГОСТ Р ИСО 20743-2012 было установлено, что НСП с CuO снижали количество выживших клеток – в 2 раза, с

ZnO +TiO₂ – в 4, с ZnO + ПАВ – в 50 раз по сравнению с контрольным образцом, не обработанным наночастицами. Таким образом, действие НСП зависит от условий культивирования, что следует учитывать при их прикладном применении.

Полученные данные открывают новые возможности для применения ЛОС в сочетании с наночастицами, а также текстиля с антибактериальным покрытием в медицине, ветеринарии, биотехнологии и других областях.

Работа выполнена при поддержке Программы научно-исследовательских и технологических работ Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научноисследовательского и технологического центра на 2020–2024 годы (Эколан Т-1.13).

ГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ АЛКАНОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДЕТЕРМИНАНТОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ДЕСТРУКЦИЮ НЕФТИ

Патрушева Е. В.^{1,*}, Бавтушный А. А.¹, Сидорук К. В.¹, Изотова А. О.², Корженков А. А.², Тоцаков С. В.², Синекий С. П.¹

¹ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», Москва, genetika@genetika.ru

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, nrcki@nrcki.ru
*lpatrush@gmail.com

Нефть, являясь самым распространенным источником энергии в мире, относится к наиболее опасным загрязнителям биосферы. Углеводороды - группа химически стойких органических веществ, которые, однако, могут разлагать многие микроорганизмы. Цель настоящей работы заключалась в оценке нефтеокисляющей способности штаммов специализированной коллекции алканотрофных микроорганизмов БРЦ ВКПМ, секвенировании и выявления детерминант, определяющих деструкцию углеводородов.

Определение нефтеокисляющей способности проводили на минеральной среде с добавлением 3 % нефти в качестве единственного источника углерода при перемешивании 250 об/мин и температуре 28 °С в течение 4 суток. Экспресс-оценку проводили визуально («Environmental Protection Agency», USA). Геномную ДНК экстрагировали, как описано ранее [1]. 0,5 нг ДНК использовали для подготовки фрагментной библиотеки с использованием набора Nextera® XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Библиотека секвенирована системой MiSeq с использованием парных прочтений длиной 250 п.н. Сборка геномов проводилась при помощи пакета конвейерной обработки ZGA (<https://github.com/laxeye/zga>). Анализ функциональных генов выполнен с использованием аннотации, предоставленной NCBI и веб-сервера RAST.

Экспресс-оценка нефтеокисляющей активности по 10 бальной шкале показала, что из 33 проверенных штаммов – 8 наиболее активных биодеструкторов (от 6 до 10 баллов), преимущественно представители родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*. Полногеномное секвенирование позволило выявить взаимосвязь между нефтеокисляющей способностью исследованных штаммов и их генотипом. Определение генетических детерминант ответственных за биоразложение нефти и других загрязнителей показало наличие у секвенированных штаммов оперонов, инициирующих катаболизм бензоата, антранилатдиоксигеназного комплекса; многокомпонентный кластер генов, кодирующих фенол-гидроксилазу; наличие генных кластеров, ответственных за первую стадию утилизации алканов, включающих алкан-1-монооксигеназу и рубредоксины в сочетании с регуляторами транскрипции.

Исследованные штаммы БРЦ ВКПМ могут быть рекомендованы для разработки препаратов биодеструкторов нефтяных загрязнений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-15-2019-1659) и проводилась на оборудовании УНУ БРЦ ВКПМ (<https://vkpm.genetika.ru/>).

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ АЛКАН МОНООКСИГЕНАЗ В ПСИХРОТРОФНОМ ШТАММЕ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРЕ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS X5*

Петриков К. В.* , Делеган Я. А. , Ветрова А. А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино,
info@pbcras.ru

*bioscience.kp@gmail.com

Первым этапом пути биологического окисления алканов является их гидроксильное, осуществляемое ферментами различных видов. Наиболее известны алкан гидроксиллазы AlkB-типа и цитохромы P450 семейства CYP153. Их изучение является важным как для понимания особенностей метаболизма алканов, так и для использования углеводородокисляющих микроорганизмов в биотехнологиях защиты окружающей среды. К хорошо известным нефтедеструкторам относятся представители рода *Rhodococcus*, и для них характерно большое разнообразие алкан монооксигеназных генетических систем.

Штамм *Rhodococcus erythropolis X5* ранее был охарактеризован как эффективный деструктор широкого спектра алканов при росте в диапазоне температур от умеренных (27–30 °C) до низких положительных (4–6 °C). Геном штамма секвенирован и полностью собран, он состоит из кольцевой хромосомы (6 472 т. п. н., GenBank acc. no. CP044284.1) и линейной плазмиды (527 т. п. н., GenBank acc. no. CP044283.1).

В данной работе был проведён поиск и анализ генов штамма X5, потенциально вовлечённых в катаболизм алканов. Хромосома содержала 5 гомологов генов алкан гидроксиллаз *alkB*, на плазмиде таких генов не обнаружено. Только один ген *alkB* был локализован в составе полного кластера, включающего также гены рубредоксинредуктазы, двух рубредоксинов и регулятора транскрипции семейства TetR. В другом найденном кластере ген рубредоксинредуктазы отсутствовал. Остальные три копии *alkB* размещались вне каких-либо известных кластеров.

10 копий генов цитохрома P450 было найдено на хромосоме, 5 – на плазмиде, при этом ни один не располагался в составе полного кластера с генами ферредоксина и ферредоксинредуктазы. Филогенетический анализ позволил достоверно отнести к семейству CYP153 только один из всех цитохромов.

Кроме вышеперечисленных, были выявлены гены, имеющие различную степень гомологии с отдельными генами других известных алкан монооксигеназных систем: деструкции длинных алканов *almA* и *ladA* и растворимых бинуклеарных железосодержащих монооксигеназ деструкции коротких алканов (*prm* и *smo*).

Таким образом, показано, что штамм X5 обладает значительным пулом генетических систем, потенциально отвечающих за первичное окисление алканов. Проведённый анализ позволит в дальнейшем оценить функциональную активность обнаруженных генов и установить их роль в метаболизме алканов в различных условиях.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА И ВИРУЛЕНТНОСТИ *SALMONELLA TYPHIMURIUM* В УСЛОВИЯХ ФАГОЦИТОЗА *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

Плотников А. О.², Балкин А. С.¹, Гоголева Н. Е.^{2,3}, Гоголев Ю. В.³, Черкасов С. В.¹

¹Лаборатория биомедицинских технологий, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

²Центр коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов», Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

³Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань

Сальмонеллы известны своей способностью вызывать тяжелые системные инфекции, а также длительно выживать и размножаться внутри клеток макрофагов человека и млекопитающих. Вне организма хозяина сальмонеллы длительно выживают и сохраняют вирулентность

в окружающей среде, например, в пищевых продуктах, почве, сточных водах и открытых водоемах. В водоемах природным резервуаром для сальмонелл служат протисты, в том числе амебы. Однако, механизмы взаимодействия сальмонелл с протистами и регуляция участвующих в этом генов остаются малоизученными. В данном исследовании мы оценили экспрессию генов сальмонелл на ранних стадиях взаимодействия с *Acanthamoeba castellanii* с применением высокопроизводительного секвенирования.

Для модельной инфекции использовали *S. enterica serovar* Typhimurium 14028S, выращенную в среде LB в течение 12 часов. Затем отмытые в стерильной среде клетки добавляли к аксеничной культуре амеб *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC® 30010™) в соотношении 100 к 1 (10^8 сальмонелл к 10^6 амеб) в среде PAS. После 2 часов сокультивирования при 25 °C внеклеточные бактерии были удалены путем трехкратной отмывки средой PAS. После отмывки клетки были собраны центрифугированием и использованы для выделения тотальной РНК.

Подход Carrable-seq (Etwiller et al., 2016) был использован для приготовления кДНК библиотек. Секвенирование проводили на платформе Illumina HiSeq 2500. Анализ дифференциальной экспрессии генов осуществляли с помощью программного пакета DESeq2 (Love et al., 2014).

Особенности экспрессии генов *S. Typhimurium* внутри клеток *A. castellanii* включают: подавление генов, кодирующих гликолиз и второй островок патогенности сальмонелл, а также усиление экспрессии генов, кодирующих гликозилатный цикл, первый островок патогенности сальмонелл, хемотаксис и флагеллярный аппарат. Кроме того, экспрессия генов, кодирующих ответ на окислительный стресс и поглощение железа, усиливалась внутри *A. castellanii* также, как и внутри фагоцитов млекопитающих.

Таким образом, глобальная экспрессия генов *S. Typhimurium* внутри *A. castellanii* помогает улучшить наши представления о молекулярных механизмах адаптации сальмонелл к условиям внутри клеток амеб, а также позволят расширить представления о резервуарной роли свободноживущих простейших.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛИЧЕСКИХ МОНОТЕРПЕНОВ (-)-ЛИМОНЕНА И (+)- α -ПИНЕНА НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Плюта В. А.^{1,*}, Мелькина О. Е.², Чурсина М. А.^{1,3}, Завильгельский Г. Б.², Хмель И. А.¹

¹НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ, Москва.

²«ГосНИИгенетика» НИЦ «Курчатовский институт», Москва

³ФГБОУ ВО РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва.

*plyutaba@gmail.com

Широкий спектр биологической активности летучих органических соединений (ЛОС), выделяемых микроорганизмами, привлек значительный научный интерес к их изучению, но механизмы действия ЛОС всё еще остаются малоизученными.

Целью данной работы является изучение механизма действия двух ЛОС циклических монотерпенов (-)-лимонена и (+)- α -пинена на бактериальные клетки.

Исследование механизма бактерицидного действия ЛОС проводили с помощью генно-инженерных биолюминесцентных штаммов *Escherichia coli*, содержащих индуцируемые промоторы, реагирующие на окислительный стресс, повреждение ДНК (SOS-ответ), повреждение белков («тепловой шок») или повреждение мембраны, транскрипционно слитые с репортерными генами *luxCDABE* *Photobacterium luminescens*. Показано, что (-)-лимонен ингибирует рост бактерий *E. coli* в три стадии. На первой ранней стадии через 20–30 мин после его добавления к клеточной суспензии в клетках образуется значительное количество активных форм кислорода – перекиси водорода и супероксид-анион-радикала, повреждающих ДНК, блокирующих репликацию и индуцирующих SOS-ответ. На второй стадии, через 30–50 мин в клетке накапливаются поврежденные белки, что индуцирует «тепловой шок». На третьей, заключительной стадии, через 1–2 часа происходит накопление повреждений в клеточной мембране, что приводит к повышению ее проницаемости и последующему разрушению. Эффект α -пинена намного слабее: он вызывает у бактерий только «тепловой шок».

Исследовано влияние ЛОС на активность ферментов люцифераз и на эффективность рефолдинга, проводимого бишаперонной системой DnaKJE-ClpV. Известно, что малые белки-шапероны IbpA и IbpV (принадлежащие семейству АТФ-независимых шаперонов sHsp) образуют комплексы с белковыми агрегатами, что приводит к ускорению процесса дезагрегации. Наличие IbpAB в смеси с белком-субстратом защищает белки от термоденатурации, снижая уровень агрегации. В клетках *E. coli* K12, мутантных по генам *ibpA*, *ibpV*, снижены начальная скорость и максимальный уровень рефолдинга. Недостаток шаперона IbpV сильнее влияет на эффективность рефолдинга по сравнению с дефектом в гене *ibpA*. Измерение кинетики и уровня рефолдинга термоинактивированных люцифераз проводили *in vivo* в клетках *E. coli* BW25113 *ibpA⁺ibpV⁺* и JW3663 *ibpV::kan*. Мы впервые показали, что (-)-лимонен полностью ингибирует рефолдинг термоинактивированной бактериальной люциферазы, как в штаммах *E. coli* дикого типа, так и в штамме, мутантном по гену *ibpV*. α -Пинен частично ингибирует рефолдинг, проводимый бишаперонной системой DnaKJE-ClpV, только у штамма, мутантного по гену *ibpV*.

Работа частично финансировалась Фондом в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ на 2020-2021 годы (№ 121030200227-6).

ПОДБОР УСЛОВИЙ ОЧИСТКИ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА SgpR, ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА LysR-СЕМЕЙСТВА

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

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН
(ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований), Пущино
*irafilatova24@gmail.com

Введение. LysR-семейство транскрипционных регуляторов является наиболее распространенным среди факторов транскрипции бактерий. В связи с тем, что белки этого семейства склонны к агрегации, их очистка в количестве, достаточном для кристаллизации, является сложной задачей. Доказательства существования единственного предложенного механизма активации транскрипции (механизма скользящего димера) на уровне конформационных изменений комплекса «ДНК-белок-индуктор» отсутствуют и для его подтверждения требуется получить соответствующие кристаллы. В 2017 году был получен препарат белка SgpR, контролирующего трансформацию салицилата в клетках *Pseudomonas putida* AK5, в концентрации 0,5 мг/мл, в то время как для кристаллизации требуется концентрация 8–10 мг/мл. Целью данной работы стал подбор условий для очистки рекомбинантного белка SgpR, позволяющий увеличить концентрацию белка в конечном препарате.

Материалы и методы. Последовательность гена, кодирующего SgpR(ACO92380.1), клонировали в плазмиде pQE30. Экспрессионный штамм *E. coli* M15[pREP4][pQE30_sgpR] выращивали в 100 мл LB при 18 °C и концентрации ИПТГ 0,02 мМ. Белок очищали с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

Результаты и их обсуждение. Концентрацию SgpR в конечном препарате не удалось увеличить всеми возможными вариантами концентрирования: белок образует агрегаты. Было решено использовать разные добавки к буферу для выделения, чтобы предотвратить саму агрегацию. В качестве «стартового» буферного раствора использовали: 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH 8,0), 500 мМ KCl, 20 мМ имидазол. Внесение 100 мМ KGlu снизило концентрацию белка до 0,17 мг/мл. Внесение 100 мкМ PGME50 не оказало существенного влияния, концентрация SgpR составила 0,54 мг/мл. При внесении других добавок удалось увеличить концентрацию белка: 100 мМ сульфат калия – 1,13 мг/мл белка, 1 % Твин20 – 1,23 мг/мл белка, 1 % CHAPS – 2,28 мг/мл. Увеличение концентрации KCl с 500 мМ до 2 М так же увеличило концентрацию SgpR в конечном препарате, она составила 1,82 мг/мл.

Заключение. Наибольшую концентрацию SgpR получили при использовании 1 % CHAPS, однако и этого недостаточно для проведения необходимых работ. В качестве одного из возможных вариантов увеличения концентрации планируем рассмотреть комбинации тех добавок, которые увеличили растворимость целевого белка.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-29-05071.

ПОЧВЕННЫЕ ШТАММЫ-ДЕСТРУКТОРЫ: БИОДЕГРАДАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К СОХРАНЕНИЮ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Поливцева В. Н.^{*}, Анохина Т. О., Есикова Т. З., Абашина Т. Н., Иминова Л. Р.,
Сузина Н. Е., Соляникова И. П.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, adm@ibpm.ru
^{*}valentina.polivtseva@yandex.ru

Важная роль в биоремедиации загрязненных почв принадлежит микроорганизмам, которые способны полностью разлагать токсичные соединения или трансформировать их до утилизируемых субстратов.

Целью работы была характеристика новых почвенных бактерий-деструкторов ароматических соединений и изучение влияния стресса (голодание, высушивание, пониженная температура, длительное хранение) на их выживаемость и биодеградативную активность.

Для выделения штаммов были использованы образцы незагрязненной и загрязненной отходами почвы России. Отбор изолятов осуществлялся методом накопительных культур. Отобранные культуры проверяли на способность утилизировать ароматические, алифатические и хлорсодержащие соединения. Определение активности ферментов проводилось в бесклеточном экстракте в соответствии с отработанной методикой. Для проверки жизнеспособности клетки подвергались воздействию: 1) имитация стресса длительного голодания, 2) высушивание и длительное хранение при 4 °С.

Для изолятов *Stenotrophomonas* sp. Fch7 и Fch8, *Rhodococcus* sp. 7B, *Pseudomonas* sp. 13BN и *Isoptericola* sp. 8BN была показана способность разлагать фенол в концентрации 0,5 г/л, для штамма *R. opacus* 3D до 1,5 г/л. Показано отсутствие *мета*-пути расщепления пирокатехина при деградации фенола этими штаммами. В бесклеточных экстрактах обнаружены активности пирокатехин-1,2-диоксигеназы и протокатехоат-3,4-диоксигеназы, активность последней была до 15 раз выше. Штаммы способны к деструкции индивидуальных поллютантов: алифатические углеводороды, хлорфенолы, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, капролактамы и др. Штамм 8BN также проявил высокую целлюлазную активность, а штамм 7B высокую способность к деструкции нефтепродуктов, фенола и его производных при высоких температурах и повышенной солёности. Показано сохранение жизнеспособности и биодеградативной активности данных штаммов после высушивания и хранения при низкой температуре в течении 6–8 мес.

Иммобилизация на волокне клеток *R. opacus* 3D приводила к увеличению концентраций фенола, разлагаемого данным штаммом и уменьшению времени его деградации. Штамм разлагал 2,5 г/л фенола за 4 сут. После длительного хранения на волокне штамм не потерял способность к деградации фенола.

Полученные микроорганизмы потенциально являются основой биопрепаратов с длительным сроком хранения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-54-80003.

АДАПТАЦИЯ РОДОКОККОВ К АССИМИЛЯЦИИ ТВЕРДЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Пунтус И. Ф.^{1,*}, Ахметов Л. И.¹, Филонов А. Е.¹, Понаморева О. Н.²

¹ФИЦ ПНЦБИ РАН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН», Пушкино, adm@ibpm.ru

²Тульский государственный университет, Тула, olgaponamoreva@mail.ru

* puntus66@mail.ru

Актинобактерии рода *Rhodococcus* широко распространены в природе. Характеризуются широкими катаболическими возможностями и уникальными ферментными системами, родококки могут деградировать разнообразные по химической структуре углеводороды.

Следует отметить, что биodeградация углеводов существенно зависит от их агрегатного состояния. Так, *n*-гексадекан при 26 °С – жидкость, а при 18 °С – твердое вещество. Родококки, способные утилизировать гидрофобные субстраты, ассимилируют углеводороды за счет: 1) гидрофобной клеточной стенки, содержащей липофильные соединения, что обеспечивает прямой контакт клеток с каплями углеводородов; 2) выделения в среду биоПАВ, которые могут солюбилизовать углеводороды в водной фазе. Целью работы было изучение особенностей адаптации родококков к деградации гидрофобных углеводородных субстратов в твердом агрегатном состоянии на примере *n*-гексадекана.

Изучена продукция биосурфактантов *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 при деградации гексадекана, находящемся в различном агрегатном состоянии. Показано, что, несмотря на твердое агрегатное состояние углеводорода, степень его деградации была высокой: 40 % для *R. erythropolis* X5 и 30 % для *R. erythropolis* S67 за 18 сут. Анализ внеклеточных липидов в культуральной жидкости показал наличие жирных кислот с длиной цепи от C₃ до C₁₆, что свидетельствует о том, что катаболизм гексадекана начинается уже в околоклеточном пространстве за счет первичных мембранносвязанных ферментов окисления углеводов. Показано, что при деградации твердого углеводорода родококками формируются специализированные клеточные структуры: внутриклеточные мембранные структуры и соединенные с клеткой электронно-плотными фибрами поверхностные везикулы. Образование многочисленных везикул при росте на твердом гексадекане также является важным адаптивным свойством, обеспечивающим увеличение площади контакта бактериальных клеток с гидрофобным субстратом. Мы полагаем, что деградация твердых углеводородов начинается на поверхности везикул, а далее гексадекан и продукты его деградации транспортируются в клетку по гидрофобным каналам (фибрам), которые предположительно образованы с участием сукциноилтрегалопидных биосурфактантов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00002\20 «Особенности синтеза поверхностно-активных соединений бактериями, эффективно утилизирующими нефть при пониженных и повышенных температурах».

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ЧАСТОТЫ ЛИЗОГЕНИЗАЦИИ *E. COLI* 4S БАКТЕРИОФАГОМ Hf4S ОТ МНОЖЕСТВЕННОСТИ ИНФЕКЦИИ

Пушкина Н. И.* , Шакирова А. Р., Летарова М. А.

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, letarova.maria@gmail.com
*natalia.pushkina00@mail.ru

Введение

Бактериофаг *Hf4S* – умеренный подовирус *E. coli*, выделенный из фекалий лошади – образует на газоне штамма *E. coli* 4S бляшки необычной морфологии в виде серии концентрических кругов просветления и бактериального роста. Мы предположили, что микроколонии внутри бляшки являются лизогенами по *Hf4S*, а причиной такой необычной формы бляшки является зависимость вероятности лизогенизации клетки хозяина от числа одновременно или почти одновременно инфицирующих фаговых частиц.

Материалы и методы

Фаг Hf4s культивировали на бактериальном газоне *E. coli* Hf4s, посеянном методом «двойного агара» при различных условиях, а также инкубировали суспензию бактерий в присутствии бактериофага различной концентрации, после чего высевали выжившие клетки на чашки с агаризованной средой.

Результаты и обсуждение

На морфологию бляшек и зон лизиса влияет содержание бактерий в агаре (чем больше бактерий, тем мельче бляшки) и содержание фага в капле (если концентрация высокая, по периметру капли образуется зона роста, если низкая – зона лизиса), но не влияет кон-

центрация агара в верхнем слое, что указывает на важность соотношения фаг/бактерия для образования зон роста предполагаемых лизогенов. Зависимость числа выживших бактерий от концентрации фага в суспензии немонотонна: сначала наблюдается спад, обусловленный лизисом клеток, а потом подъём, предположительно связанный с ростом числа лизогенов при высоких концентрациях фага.

Выводы

Экспериментальные данные согласуются с нашим предположением о зависимости частоты лизогенизации *E. coli* 4S фагом *Hf4S* от множественности инфекции, но для более чёткого понимания процесса необходимы дальнейшие исследования.

СБОРКА ЖГУТИКОВ ГАЛОАРХЕЙ В ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ СИСТЕМЕ

Пятибратов М. Г.^{1,*}, Сюткин А. С.¹, Безносков С. Н.¹, Чесноков Д. О.¹, Галева А. В.¹, Щеголев С. Ю.²

¹Институт белка РАН, Пущино, protres@vega.protres.ru

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, mail@ibppm.ru
*bratov@vega.protres.ru

Введение

Жгутики архей (археллы) являются уникальными органеллами подвижности, строение которых принципиально отличается от бактериальных аналогов. Одной из характерных особенностей архей является множественность генов, кодирующих структурные субъединицы археллы. В данной работе мы исследовали экспрессию археллиновых генов представителей различных групп галофильных архей и сборку рекомбинантных архелл в гетерологичном хозяине *Haloferax volcanii*. Целью работы было выяснить роль множественных археллинов в формировании надмолекулярной структуры археллы, понять, как особенности структуры археллинов могут влиять на сборку археллы, её форму и стабильность.

Материалы и методы

В работе использовались ауксотрофные штаммы *Hfx. volcanii* сконструированные для генно-инженерных манипуляций с делецией гена *pyrE*, участвующего в синтезе пиримидинов (Allers *et al.*, 2010). В штамме MT78 делетированы собственные гены археллинов *arlA1* и *arlA2*, в штамме RE26 эти гены содержатся. Были получены плазмидные конструкции для триптофан-индуцируемой экспрессии генов археллинов представителей трех родов галоархей: *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum lacusprofundi* и *Haloarcula hispanica*. Для изучения синтезируемых структур использовали масс-спектроскопию, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, электронную микроскопию. Для оптимизации выбора мест вставки, кодирующей FLAG-пептид, в модифицированные ею гены археллинов использовали методы молекулярного моделирования и сравнения 3D-структур белков, предсказания мест связывания углеводов при их гликозилировании.

Результаты и обсуждение

Показана возможность сборки функциональных архелл *Hbt. salinarum* и *Hrr. lacusprofundi* в гетерологичной системе *Hfx. volcanii*. При экспрессии чужеродных археллиновых генов в неподвижном штамме *Hfx. volcanii* MT78 подвижность клеток восстанавливалась. Синтезируемые рекомбинантные и природные археллы обладали сходными свойствами. Показано, что функциональные археллы могут формироваться из продукта единственного археллинового гена, при этом для *Hrr. lacusprofundi* стабильность однокомпонентных архелл была существенно ниже, чем двухкомпонентных.

При экспрессии в *Hfx. volcanii* MT78 археллиновых генов *Har. hispanica* чужеродные археллины синтезируются и секретятся из клетки, но функциональные археллы не формируются. Наблюдались сферообразные агрегаты диаметром около 50 нм, часто объединенные в протяженные комплексы. Подобные результаты были получены и при гетерологичной экспрессии археллинового гена *arlA1 Hbt. salinarum*, модифицированного вставкой, кодирующей FLAG-пептид.

Показана возможность сополимеризации археллинов различных родов галоархей *in vivo*. При гетерологичной экспрессии археллиновых генов *Hbt. salinarum*, *Hrr. lacusprofundi* и

Har. hispanica в подвижном штамме *Hfx. volcanii* RE26, содержащем собственные археллиновые гены, формировались химерные жгутики с значительной (до 70%) долей чужеродных археллинов. Во всех случаях химерные археллы сохраняли функциональность. Модифицированный археллин ArlA1 *Hbt. salinarum* также способен сополимеризоваться с археллинами *Hfx. volcanii*. С помощью иммуноэлектронной микроскопии показано, что этот археллин равномерно распределен вдоль филаментов.

Заключение

Полученные результаты позволяют лучше понять общие принципы формирования макромолекулярных сборок на клеточных поверхностях и могут использоваться при биоинженерии модифицированных архелл с заданными свойствами.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00613 А).

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Рогов А. Г.^{1,*}, Голева Т. Н.¹, Епремян Х. Х.¹, Киреев И. И.², Звягильская Р. А.¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, info@fbras.ru

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, fxb@genebee.msu.su.

*lloss@rambler.ru

Митохондрии, помимо общеизвестной роли в энергозапасании, выполняют и другие жизненно важные функции в клетке. Они глубоко интегрированы в общий клеточный обмен, играют основную роль в таких глобальных процессах, как проведение клеточных сигналов, в системе выбора клетки между жизнью и смертью, являются основными источниками активных форм кислорода в клетке. Дисфункция митохондрий приводит к старению и многочисленным патологиям. Митохондрии, в отличие от других органелл, постоянно меняют свои размеры и форму, подвергаясь непрерывному процессу слияния и фрагментации. Динамика митохондрий играет важную роль в восстановлении функций поврежденных органелл путем их смешивания с интактными органеллами. В последнее время появляется все больше исследований, связывающих нейродегенеративные и другие заболевания с дисфункцией митохондрий, а именно, с нарушением их динамики и зависимым от митохондрий окислительным стрессом.

Цель работы заключалась в моделировании и прослеживании процесса развития окислительного стресса в клетках дрожжей.

В качестве объекта исследования использовали дрожжи *Dipodascus magnusii*, гигантские клетки, содержащие в норме разветвленный митохондриальный ретикулум, что делает их идеальной моделью для такого рода исследований. Окислительный стресс индуцировали добавлением прооксиданта *tert*-бутилгидропероксида (*t*-ВНР). Окислительный стресс детектировали методами флуоресцентной микроскопии, Time-lapse микроскопии и проточной цитометрии.

Показано, что воздействие прооксиданта *t*-ВНР приводило сначала к появлению активных форм кислорода в митохондриях, а затем, спустя определенный лаг-период, к генерализации окислительного стресса по всей дрожжевой клетке. Предварительная инкубация дрожжей с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 снижала уровень окислительного стресса в клетках, но не отдаляла начало его распространения во времени. Митохондриальный ретикулум дрожжей под действием окислительного стресса подвергался фрагментации, которая всегда предшествовала генерализованному окислительному стрессу.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых-кандидатов наук МК-1260.2020.4.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБОВ СТИМУЛИРОВАНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КАРБОНАТОВ МИКРОБНЫМ СООБЩЕСТВОМ ИЗВЕСТНЯКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕСТАВРАЦИОННЫХ ЦЕЛЯХ

Руденко А. П., Комова А. В., Мельникова А. А., Намсараев З. Б.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт», Москва
*inasty5@mail.ru

Большое количество памятников и сооружений, имеющих историческую ценность, построено с использованием материалов из карбоната кальция (известняк, мрамор). При этом данные материалы подвержены разрушению из-за неподходящих условий эксплуатации, а также воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Возможности классических реставрационных методов в настоящее время ограничены, поэтому поиск альтернативных и безопасных подходов к восстановлению и сохранению данных объектов является актуальной задачей, теоретически и практически значимой. Целью данной работы является изучение микроорганизмов, способных к образованию минералов карбоната кальция, и способов стимулирования естественного микробного сообщества известняка, для применения в реставрации и сохранении архитектурных сооружений.

С образцов известняка было выделено 17 культур аэробных органотрофных микроорганизмов, 8 из которых способны к заметному образованию карбоната кальция. С применением синхротронных методов было установлено, что кристаллической фазой полученного карбоната кальция является кальцит. Часть выделенных микроорганизмов была идентифицирована на основе гена 16S рНК.

Из семи изученных сред наиболее эффективной для стимуляции микроорганизмов, способных к карбонатообразованию, оказалась среда на основе мочевины с добавлением никеля. Прочность известняка, обработанного средой на основе мочевины, увеличилась на 23 % по сравнению с прочностью необработанного известняка, что свидетельствует о большом потенциале применения данного метода для реставрации и сохранения памятников и сооружений из известняка.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ НУКЛЕОИДА Lsr2 и mIHF RHODOCOCCUS PYRIDINOVORANS 5AP

Рыжих Ю.С.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.^{2,}*

¹Тульский государственный университет, Тула,

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К.Скрябина РАН, Пущино
*irafilatova24@gmail.com

Введение. Белки нуклеоида, влияя на компактизацию бактериальной хромосомы, участвуют в регуляции экспрессии генов в качестве глобальных регуляторов. Белки нуклеоида актинобактерий изучены преимущественно для микобактерий. В микроорганизмах рода *Rhodococcus* обнаружены ортологи генов, кодирующих Lsr2, белок семейства HNS, и mIHF, белок семейства IHF. В связи с тем, что указанные белки принимают участие в регуляции экспрессии внехромосомной ДНК и в горизонтальном переносе генов, а некоторые гены катаболизма углеводов нефти располагаются на плазидах, было решено получить препараты белков Lsr2 и mIHF микроорганизма-нефтедеструктора *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap для дальнейшего исследования их вклада в процессы биodeградации.

Материалы и методы. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки Lsr2(QOV99246.1) и mIHF(QOW00722.1), были клонированы в плазмиде pQE30, что в дальнейшем позволило очистить их с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии за счет наличия на N-конце белков аминокислотной последовательности, состоящей из шести гистидинов. Штамм продуцент *E.coli* M15[pREP4], содержащий соответствующую рекомбинантную плазмиду, выращивали при температуре 37 °С до ОП 0,5, охлаждали в течение 15 минут до 18 °С. После добавления ИПТГ до конечной концентрации 0,02 мМ, клетки вы-

ращивали при постоянном перемешивании при 18 °С в течение 18 часов, после чего биомассу собирали путем центрифугирования. Для разрушения клеток и нанесения бесклеточного экстракта на хроматографическую колонку использовали буфер следующего состава: 100мМ калий-фосфатный буфер (рН 8,0), 500 мМ хлорид калия, 20мМ имидазол. Элюировали образцы буфером следующего состава: 100 мМ калий-фосфатный буфер (рН 8,0), 500 мМ хлорид калия, 250 мМ имидазол.

Результаты. Были получены электрофоретически гомогенные препараты белков Lsr2 (концентрация 0,205 мкг/мкл) и mIHF (концентрация 0,8 мкг/мкл).

Закключение. Гены, кодирующие белки нуклеоида Lsr2 и mIHF *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar, не только являются ортологами генов, кодирующих Lsr2 и mIHF микобактерий, но также имеют идентичное генное окружение (если сравнивать одни и те же гены белков нуклеоида у разных видов). Полученные препараты позволяют оценить вклад Lsr2 и mIHF в регуляции экспрессии катаболических генов, имеющих плазмидную локализацию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-29-05071.

БИОДЕСТРУКЦИЯ ФТАЛАТОВ ГРИБАМИ БЕЛОЙ ГНИЛИ

Савинова О. С.*, Глазунова О. А., Моисеенко К. В., Фёдорова Т. В.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва

*savinova_os@rambler.ru

Фталаты – ксенобиотики, негативно влияющие на эндокринную систему человека. Используются в качестве пластификаторов и детектируются почти во всех объектах окружающей среды. Перспективным способом их биодеструкции является применение ферментов микроорганизмов. Цель работы – изучение биодеструкции эфиров фталевой кислоты (диэтилфталата (ДЭФ) и дибутилфталата (ДБФ)) грибами белой гнили из разных таксономических и экофизиологических групп.

Штаммы базидиомицетов *Trametes hirsuta*, *Steccherinum ochraceum*, *Peniophora lycii*, *Crucibulum leave* и *Agrocybe praesox* получены из Коллекции культур Ботанического института им. Комарова (Санкт-Петербург, Россия). Общую оксидазную активность грибов и ингибирование их роста оценивали на агаризованном Мальтаксе с добавлением ДЭФ и ДБФ (0,5; 1,0 и 1,5 г/литр). Для оценки способности к биодеструкции фталатов грибы выращивали глубинным способом на глюкозно-пептонной среде при 180 об/мин, 27 °С, мицелий переносили в среду того же состава с заменой пептона на NaNO₃ и добавлением 1 г/л фталатов, культивировали при 25 °С и 100 об/мин. Образцы культуральной жидкости отбирали на 6, 10, 14 и 20 сут., экстрагировали трижды дихлорметаном (ДХМ). Содержание ДЭФ и ДБФ в экстрактах оценивали методом тонкослойной хроматографии. Элюировали дважды в смеси ДХМ/Гексан (2:1 об./об.).

Показано снижение скорости роста на агаризованной среде при добавлении фталатов. ДЭФ сильнее ингибировал рост всех грибов по сравнению с ДБФ. При этом только *T. hirsuta* и *P. lycii* были способны к росту на среде с максимальной концентрацией ДЭФ.

Показано повышение оксидазной активности при росте на среде с ДЭФ для *T. hirsuta* и *A. praesox*, на среде с ДБФ – для *S. leave*, по сравнению с ростом на контрольных средах без фталатов.

T. hirsuta и *P. lycii* полностью деградируют ДБФ в течение 20 дней с образованием метаболитов. Скорость деструкции ДЭФ грибами *T. hirsuta* и *P. lycii* была значительно ниже по сравнению с ДБФ, что коррелирует со скоростью их роста на твердых агаризованных средах в присутствии данных фталатов.

Таким образом, грибы белой гнили способны к деградации фталатов, эффективность которой зависит от ферментативной системы конкретного вида. Результаты работы могут быть использованы для разработки технологии биодеструкции фталатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 21-14-00306.

ШТАММ *PANTOEA CYPRIPEIDII* 4A – ПРОДУЦЕНТ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Сазонова О. И. , Ветрова А. А., Соколов С. Л.*

ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пущино, adm@ibpm.ru
*sazonova_oi@rambler.ru

Введение. Экзополисахариды (ЭПС) – природные высокомолекулярные углеводные биополимеры с уникальными физическими, химическими, механическими и биологическими свойствами; широко применяются в пищевой и нефтяной промышленности, фармацевтике и медицине. Поскольку для каждой отрасли требуются биополимеры с различными характеристиками, то поиск новых бактерий, обладающих высоким потенциалом в отношении синтеза высокомолекулярных ЭПС, имеет первостепенное значение для промышленности.

Цель работы. Поиск, выделение и характеристика бактериального штамма, способного к продукции высокомолекулярных экзополисахаридов.

Материалы и методы. Штамм 4A выделен методом прямого высева на среду R2A, видовую принадлежность определяли с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и секвенированием фрагмента гена 16S рРНК. ЭПС из культуральной среды высаждали тремя объемами изопропанола. С образцом ЭПС проведены: реакция Подобеда – Молиша, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) для определения молекулярно-массового распределения и средней молекулярной массы ЭПС, измерение динамической вязкости раствора ЭПС.

Результаты и обсуждение: Штамм *Pantoea cypripedii* 4A выделен из лесной подстилки, смешанной с верхним слоем почвы. При выращивании на минеральной среде с 5 % сахарозы в течение 24 часов изолят продуцирует ЭПС, что подтверждено качественной реакцией на углеводы с -нафтолом. Выход сухого продукта составил 8,5 г/л. ВЭЖХ позволила установить, что образец ЭПС имел высокомолекулярный пик 1,69 млн Да на уровне 23 % от общей площади пиков, а также пик с максимумом 1750 Да –55 % площади. Динамическая вязкость 10 % водного раствора ЭПС, продуцируемого микроорганизмом при температуре 30 °С, составила 1,728 мПа×с.

Заключение. Штамм *Pantoea cypripedii* 4A способен к продукции высокомолекулярных ЭПС в значительном объеме и может быть использован в промышленном производстве.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВНЕСЕНИЯ ПОЛЛЮТАНТОВ И ИЗМЕНЕНИЙ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА УРОВЕНЬ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ КАТАБОЛИЧЕСКИХ ГЕНОВ В АНАЭРОБНЫХ МИКРОБИОЦЕНОЗАХ

Самков А. А. , Круглова М. Н., Шульга Е. С., Чугунова Ю. А., Волченко Н. Н., Худокормов А. А., Шеуджен Т. М., Самкова С. М.*

**Кубанский государственный университет, Краснодар, rector@kubsu.ru
*andreysamkov@mail.ru**

Целью работы является развитие новых направлений экологической биотехнологии, направленных на использование катаболического потенциала микробиоценозов анаэробных природных сред для очистки последних от различных антропогенных загрязнителей при помощи биоэлектрохимических систем, интенсифицирующих процесс. Оценка изменений анаэробного микробиома, в результате внесения органических поллютантов и изменения электрохимических условий, осуществляли посредством измерения относительного присутствия в образцах тотальной ДНК набора бактериальных генов, ответственных за различные этапы катаболизма распространенных антропогенных загрязнителей.

Для оценки относительной представленности бактериальных катаболических генов в тотальной ДНК сравнивали результаты ПЦР в реальном времени по соответствующим рас- пространенным праймерам с результатами по универсальным праймерам гена одного из ге- нов домашнего хозяйства – 16s rRNA. Параллельно количественными методами определяли убыль внесенных поллютантов. В качестве генов использовали ген толуолдиоксигеназы – TOD, толуолмонооксигеназы – RMO, RDEG, нафталиндоксигеназы – NAH, ксилолмонооксигеназы – TOL, фенолмонооксигеназы – PHE, атразинхлоргидролазы – AtzA, алкенмонооксигеназы – amoA, нитрофенолмонооксигеназ – прсА, прсВ, бифенилдиоксигеназ – ВРН1, ВРН2, ВРН3. В качестве модельных поллютантов были взяты фенол, м-ксилол, пестицид имидаклоприд и нефть, которые вносили в донный ил. Для изменения биоэлектрoхимических условий использо- вали микробные топливные элементы бентосного типа (БМТЭ), где анод был размещен в образцах донного ила, а катод расположен в слое воды над анодом. Естественная поляризация обеспечивалась деятельностью электрогенных микроорганизмов, а также биогеохимической разницей редокс-потенциалов анаэробной иловой и более аэробной водной сред.

Было обнаружено, что внесение поллютантов разнонаправленно и в разной мере влияет на относительную представленность катаболических генов. Внесение нефти стимулировало рост относительного присутствия генов AtzA, TOD, amoA, NAH и ВРН1 по сравнению с количе- ственным показателем этих генов в интактном иле. Внесение имидаклоприда увеличило по- казатель генов прсА, AtzA и amoA. Внесение фенола и мета-ксилола оказало положительный эффект на рост относительной представленности генов TOD, ВРН1 и amoA. Внесение фенола также увеличило показатель гена TOL.

Изменение электрoхимических условий также разнонаправленно влияло на показатель представленности генов в тотальной ДНК из образцов биопленок подключенного ко внешней цепи анода, относительно не подключенного, и зависело как от исследуемого гена, так и от поллютанта-индуктора.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕЛАГИЧЕСКИХ МИКРОБНЫХ СООБ- ЩЕСТВ В ЗОНЕ И ВНЕ ЗОНЫ РАЗГРУЗКИ МЕТАНОВЫХ СИПОВ В МОРЕ ЛАПТЕВЫХ

Самылина О. С.¹, Русанов И. И.¹, Тарновецкий И. Ю.¹, Пименов Н. В.^{1,}*

¹ Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы био- технологии» РАН, 117312 г. Москва,
*npimenov@mail.ru

Шельфовые моря восточной Арктики, в том числе море Лаптевых, известны как мощ- ные источники эмиссии метана в атмосферу. Для зон разгрузки метановых сипов характерны высокие концентрации растворённого метана, в некоторых случаях достигающие 5000 нМ. Повышенные концентрации метана в атмосфере и водной толще арктических морей обычно связывают с активностью многочисленных метановых сипов и адвективным переносом рас- творённого метана от зон разгрузки. Несмотря на безусловное влияние метановых сипов на концентрацию растворённого метана в водной толще моря Лаптевых, вопрос о возможности биологической продукции метана *in situ* остаётся открытым.

С целью выявления потенциальных агентов микробной продукции метана в аэробных условиях водной толщи моря Лаптевых в данной работе было проведено сравнительное изу- чение гидрохимических параметров, а также определение таксономического разнообразия и функциональной активности пелагических микробных сообществ на станциях, расположен- ных как в поле метановых сипов, так и на удалении от них.

Содержание растворённого метана в водной толще на обеих станциях имело сопоста- вимые значения вплоть до глубины расположения пикноклина (25 м). На этой глубине были зафиксированы локальные максимумы содержания метана с наибольшим значением (116 нМ CH₄) на станции, удалённой от метанового сипа. Данные секвенирования гена 16S рРНК и измерения активности гидрогенотрофного метаногенеза свидетельствуют об отсутствии в зоне пикноклина и в других исследованных горизонтах водной толщи метаногенеза, обусловленно- го метаногенными археями. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, выявленное

на основании секвенирования гена 16S рНК, а также радиоизотопное измерение первичной продукции (ПП), активности темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ) и скорости окисления метана (МО) указывают на функционирование в пелагиали моря Лаптевых микробного сообщества, способного в олиготрофных условиях арктического бассейна трансформировать широкий спектр органических соединений. В результате нашего исследования выявлены гидрохимические предпосылки и возможные микробные агенты для аэробной продукции метана через деметилирование метилфосфоната и при разложении диметилсульфониопропионата. Наши данные позволяют предположить продуцирование метана *in situ* в аэробных условиях водной толщи моря Лаптевых за счёт РОВ, которое синтезируется в значительном количестве в ходе процессов ПП, ТАУ и МО, однако проблема требует дальнейшего изучения.

Авторы выражают искреннюю благодарность Якушеву Е.В. (НИВА), Гринько А. А. (ТПУ), Семилетову И.П. (ТОИ ДВО РАН), сотрудникам ИНМИ РАН Захаровой Е. Е., Меркелю А. Ю. и Канапацкому Т. А., а также команде 73 рейса НИС «Академик Мстислав Келдыш» за предоставленные возможности и всестороннюю помощь при сборе и анализе образцов.

АЦИДОТОЛЕРАНТНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ РОДА *MICROMONOSPORA* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ

Синёва О. Н.* , Терехова Л. П., Бычкова О. П., Куварина А. Е.

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе,
Москва, instna@sovintel.ru
*olga.sineva81@yandex.ru

Распространение патогенных микроорганизмов, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам, является одной из важнейших проблем современной медицины. Actinomyцеты являются продуцентами биологически активных соединений, обладающих антибактериальным, антифунгальным и противоопухолевым действием. Для выделения актиномицетов – потенциальных продуцентов новых антибиотиков из мест их естественного обитания (почвы, водоемов, тканей растений) разрабатываются селективные методы, а также проводится поиск новых экологических ниш, в которых могут быть найдены ранее не изученные актиномицеты. Actinomyцеты рода *Streptomyces* являются лидерами по количеству синтезируемых антибиотиков, однако существует большое количество актиномицетов редких родов, которые могут быть продуцентами новых антибиотиков, но для их выделения требуются особые условия.

Цель: выделить актиномицеты редких родов из почвенного образца и изучить их антибиотическую активность.

Материалы и методы. Образец дерново-подзолистой почвы был предварительно обработан в течение 30 минут 30 % и 50 % соком лимона. Высев почвенной суспензии производили на среду Гаузе № 2, культивировали при температуре 28 °С. Антибиотическую активность в отношении тест-организмов: *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37. Фенотипические признаки изучали при помощи микроскопа OLIMPUS BX-41. Анализ изомеров диаминопимелиновой кислоты и анализ дифференцирующих сахаров в гидролизатах клеток определяли с помощью методов восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном слое. Выделение ДНК проводили, используя набор для выделения Power Soil DNA Isolation Kit (МО BIO, США). Амплификацию проводили на автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США, используя набор реагентов фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США)). Для определения нуклеотидной последовательности использовали праймеры: 27f, 341f, 785f, 1495r фирмы «СИНТОЛ» (Россия). Секвенирование проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

В настоящем исследовании было проведено выделение актиномицетов из дерново-подзолистой почвы с использованием сока лимона. Всего было выделено 82 культуры актиномицетов, 11 культур было отнесено к роду *Micromonospora*. Выделенные культуры рода *Micromonospora* обладали устойчивостью к низким pH = 2-2,5 из них 6 культур были способны расти на жидких средах в течение 7 суток при добавлении сока лимона в питательную среду в концентрации 50 %, pH = 2. Все культуры обладали антибиотической активностью в отношении грамположительных, грамотрицательных тест-организмов и грибов. Выделенные актиномицеты рода *Micromonospora* можно рассматривать в качестве потенциальных продуцентов новых антибиотиков.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МУТАНТНОЙ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ДВОЙНОЙ КОФАКТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Сливинская Е. А.*, Плеханова Н. С., Альтман И. Б., Ямпольская Т. А.

Акционерное общество «Ajinomoto- Genetika Research Institute»,
Москва, agri-ofc@agri.ru
*katya_slivinskaya@agri.ru

Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГАФДГ) – один из ключевых ферментов центрального метаболизма клетки. НАД⁺-зависимый гликолитический фермент обнаружен во многих организмах, включая *E.coli*. Ряд организмов содержит НАДФ⁺-зависимую ГАФДГ, образующую НАДФН, необходимый для синтеза многих промышленно ценных продуктов. Изменение кофакторной специфичности собственных ферментов усиливает синтез НАДФН бактериальной клеткой.

Ранее заменой ряда аминокислот в кофермент-связывающем центре фермента была получена ГАФДГ *E.coli* с двойной кофакторной специфичностью. Задача данной работы - определение и сравнение кинетических параметров полученных ферментов. Белки были экспрессированы в клетках *E.coli*, для частично очищенных ферментов были определены кинетические характеристики.

Коферментную специфичность ГАФДГ во многом определяет 34-й аминокислотный остаток (аспартат у *E.coli*). Замена кислого остатка аспартата неполярным аланином устраняет электростатическое отталкивание между аминокислотной карбоксильной группой и фосфатной группой НАДФ⁺, способствует стабилизации водородных связей и одновременно увеличивает объем кофермент-связывающего кармана. В то же время положительно заряженный лизин в положении 34 способствует удержанию НАДФ⁺ в кофермент-связывающем кармане. В результате оба мутантных белка приобретают двойную специфичность, но сродство мутанта D34K к НАДФ⁺ существенно выше, чем у D34A; сродство к НАД⁺ снижено у обоих мутантов.

В холоферменте дикого типа аминокислотные остатки глицина G188 и пролина P189 расположены в средней части S-петли каждого мономера. Они не участвуют в образовании гидрофобных кластеров, способствуя, по-видимому, оптимальному связыванию кофермента. Замена остатков глицин-пролин на треонин-лизин, вероятно, приводит к увеличению объема кофермент-связывающего кармана, что выражается в довольно высокой НАДФ⁺-специфической активности; параметры связывания белка G188T-P189K с НАД⁺ сопоставимы со значениями, характерными для ГАФДГ дикого типа. Мутанты с тремя заменами D34A G188T-P189K показывают одинаковое сродство к обоим кофакторам.

Таким образом, был создан ряд мутантных ГАФДГ *E.coli* с двойной кофакторной специфичностью, различных по уровню активности фермента и сродству к НАД⁺/НАДФ⁺. В зависимости от поставленных задач полученные ферменты могут использоваться в продуцентах промышленно значимых веществ, сконструированных на основе *E.coli*.

РОЛЬ ТИЛОВЫХ РЕДОКС-СИСТЕМ В ФОРМИРОВАНИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ К КАНАМИЦИНУ У РАСТУЩИХ И ГОЛОДАЮЩИХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Смирнова Г. В.* , Тюленев А. В., Музыка Н. Г., Октябрьский О. Н.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермский федеральный исследовательский центр, Пермь,
*smirnova@iegm.ru

Воздействие антибиотиков на бактерии приводит к кардинальным перестройкам метаболизма, которые строго регулируются на ферментативном и транскрипционном уровне с участием различных сигналов, в том числе редокс-сигнализации. Задачей нашей работы являлось изучение вклада изменений редокс-статуса клеток в развитие толерантности к канамицину (Кан) и образование персистеров в растущих и голодающих по фосфату (Pi) культурах *E. coli*. Объектом исследований служили нокаут мутанты по тиоловым редокс-системам из коллекции Keio, с предварительно удаленной кассетой устойчивости к Кан. Двойные мутанты *gshAtrxA* и *gortrxB* создавали путем трансдукции с фагом P1. Бактерии выращивали на среде MOPS с глюкозой и фосфатом в 250-мл колбах на качалках (150 об/мин) при температуре 37 °С. В экспериментах с голоданием растущую культуру центрифугировали и переносили в среду MOPS с глюкозой без фосфата. Используя систему электродов, осуществляли real-time мониторинг pO_2 , Eh, K^+ и сульфида. Для характеристики редокс-статуса определяли восстановленный (GSH) и окисленный (GSSG) глутатион, супероксид, H_2O_2 и экспрессию генов *katG*, *katE*, *sodA*, *sulA*. Мембранный потенциал ($\Delta\psi$) измеряли с помощью красителя DiBAC₄(3). Чувствительность к канамицину изучали, определяя минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) и способность к образованию колоний (КОЕ).

Мутанты различались по скорости роста, дыхания и уровню $\Delta\psi$. Концентрация GSH_{in} была максимальна у *gor* и минимальна у *trxA* ($11,5 \pm 0,1$ и $3,7 \pm 0,1 \mu M/OD_{600}$). Мутанты имели повышенный уровень $GSSG_{in}$, что свидетельствует о снижении тиол-дисульфидного статуса клеток. В растущей культуре все мутанты, кроме *gshA*, генерировали супероксид с более высокой скоростью, чем wt. Мутанты *trxA*, *trxB*, *trxAgshA* и *trxBgor* показали более высокий уровень экспрессии *katG*, в 1,2, 1,5, 8,8 и 5,3 раза соответственно. Напротив, экспрессия *sodA* у мутантов *trxB*, *trxAgshA* и *trxBgor* была в 2 раза ниже, чем у родителя. Голодание по Pi приводило к торможению роста и дыхания, временному повышению уровня сульфида в среде, возрастанию GSH_{in} и продукции супероксида. Накопление H_2O_2 в среде значительно снижалась, вероятно, вследствие 2-кратной индукции генов *katG* и *katE*. МИК канамицина равнялась 16 мкг/мл у всех штаммов, за исключением *gshAtrxA* и *gortrxB*, имевших МИК 8 мкг/мл. МБК равнялась 30 мкг/мл у родителя и 20 мкг/мл у *gshAtrxA*. Добавление Кан (30 мкг/мл) в аэробно растущие культуры приводило к быстрому падению числа КОЕ, более выраженному у *gshAtrxA*. Через 4 часа 60% wt клеток утрачивали $\Delta\psi$. Наличие мутаций ускорило потерю $\Delta\psi$. Через 24 часа число персистеров снижалось практически до 0 у всех мутантов, за исключением *gor*. Все испытанные мутанты медленнее развивали устойчивость к Кан при голодании по Pi, оставаясь в течение 2 часов в 100 раз чувствительнее, чем wt. Однако через сутки голодания устойчивость к Кан приобретали практически все клетки, независимо от наличия мутаций. Нарушение нормального процесса адаптации к стрессу, вызванному антибиотиком, и к условиям голодания у мутантов по тиоловым редокс-системам может быть причиной их пониженной толерантности к Кан по сравнению с родителем.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1 и поддержана грантами РФФИ № 19-04-00888 и Президента РФ № МК-420.2020.4.

ВЛИЯНИЕ СООБЩЕСТВ ПЕРИФИТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОРСКИХ ПРОТИВООБРАСТАЕМЫХ ПОКРЫТИЙ

Смирнова Л. Л.

Институт природно-технических систем, Севастополь, ipts-sevastopol@mail.ru
inik48@inbox.ru

Противообрастаемые покрытия защищают подводный борт различных плавсредств от макрообрастания. В морской среде на их поверхности формируется биопленка микрообрастания – сообщество перифитонных микроорганизмов (СПМ) или микроперифитон. На покрытиях, содержащих органические полимерные материалы (матрица), биоцидные соединения или нанодобавки, СПМ функционирует в течение всего срока их эффективной защиты от макрообрастания. Постоянными компонентами СПМ являются гетеротрофная, хемоорганотрофная микрофлора, диатомовые водоросли (ДВ) и продукты метаболизма. Цель работы – изучение влияния СПМ на эффективность современных противообрастающих покрытий.

Испытания модельных покрытий с растворимой матрицей, биоцид – закись меди и изготовленных по нанотехнологиям проводили в прибрежной акватории б. Севастопольская (г. Севастополь, Крым). В биопленке микрообрастания определяли численность и видовую принадлежность ГБ и ДВ, величину pH, количество карбонатных соединений. Для изучения механизма деструкции органической матрицы и состава метаболитов использовали ИК-спектроскопию и R-спектральный анализ.

Исследования показали, что в бактериальной составляющей микроперифитона доминируют грамотрицательные ГБ родов *Vibrio*, *Bacillus*, *Halobacterium*, *Pseudomonas*, численность которых после 50–60 суток испытаний в море стабилизируется на уровне 10^4 – 10^5 кл/см². В автотрофной составляющей в весенний сезон доминируют ДВ родов *Striatella*, *Amphora Licmophora*, в осенний – *Amphora*, *Amphiprora*, *Navicula*.

Методом ИК-спектроскопии показано, что ионы меди в биопленке микрообрастания связываются в аммиачные комплексы в результате продуцирования аммиака в процессе ассимиляционного восстановления нитритов СПМ и ослабляют свое токсичное действие на микроорганизмы. При биоразрушении растворимой органической матрицы покрытий преобладают процессы деструкции карбоксильных и карбоксилатных групп, разрушения ненасыщенных связей в ароматических и алифатических углеводородах. В биопленке микрообрастания на составах с закисью меди наблюдается отложение карбонатов кальция и меди (содержание до 5–6 %).

Методом R-спектроскопии изучены особенности распределения в биопленке микрообрастания антиадгезионных покрытий (нанотехнологии) кальцита и кварца, которые экранируют поверхность покрытия и нарушают противообрастающие свойства особенно антиадгезионных составов. Кроме того, органические и неорганические продукты метаболизма СПМ регулируют величину pH биопленки микрообрастания, которая ниже, чем в морской воде и изменяется в диапазоне 7,55 до 8,00.

Таким образом, СПМ в процессе биоразрушения органической матрицы покрытий влияет на механизм их работы. Наблюдаются изменения химических свойств органической матрицы в результате трансформации функциональных групп и подкисления поверхностного микрослоя покрытий. Эффективность действия покрытий снижают толщина развивающейся биопленки микрообрастания и отложение продуктов метаболизма СПМ – аморфных карбонатных соединений, кальцита и кварца, что необходимо учитывать при составлении новых противообрастающих композиций.

ПЕРВЫЙ ЛИТОАВТОТРОФНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ РОДА

SPHAEROTILUS – *S. SULFIDIVORANS*

Смоляков Д. Д., Москвитина М. И., Филатова О. А., Грабович М. Ю.

Воронежский государственный университет
songolifreya@mail.ru +79601060129

Введение. Ранее считалось, что род *Sphaerotilus* имеет преимущественно органогетеротрофный тип метаболизма и обитает в стоячих водоемах, а также в антропогенных системах очистных сооружений, являясь причиной технологических проблем, таких как засорение труб и вспучивание активного ила. *Sphaerotilus sulfidivorans* был выделен из умеренных термальных сероводородных источников. Для него впервые была показана способность к литогетеротрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы. Получение геномных сиквенсов позволило выявить их потенциальную возможность к литоавтотрофному росту. Таким образом, универсальность метаболизма ряда представителей рода *Sphaerotilus* объясняет их доминирование в активном иле очистных сооружений.

Материалы и методы: методы биоинформатики, биохимии, ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты и обсуждение. При анализе генома *S. sulfidivorans* D-507 (GCA_008329925.1) были обнаружены две системы диссимиляционного превращения соединений серы: прямой Sox-путь (*soxXYZBCD*), осуществляющий окисление тиосульфата до сульфата; системы окисления сероводорода до полисульфида/серы: сульфид:хинон оксидеродуктаза (*sqrFE*) и флавоцитохром с-сульфиддегидрогеназа (*fccAB*). Также обнаружены все гены автотрофной ассимиляции углекислого газа через цикл Кальвина. РБФК представлена IC типом.

Несмотря на наличие всех генов прямого Sox-пути, бактерии оказались не способны к литоавтотрофному росту в присутствии тиосульфата. Однако при росте, где единственным донором электронов являлся сероводород, бактерии показали стабильный прирост белка в течение нескольких пассажей (30 мг/л). Был исследован уровень относительной экспрессии генов *sqrF*, *fccB* и *rbcL*, экспрессия которых при литоавтотрофном росте в сравнении с органогетеротрофным увеличивалась в 33, 6 и 17 раз, соответственно. Активность фосфорибулокиназы обнаружена только в литоавтотрофных условиях, а активность карбоангидразы возросла в 9,5 раз в литоавтотрофных условиях по сравнению с органогетеротрофными.

Выводы. Доказана способность *S. sulfidivorans* D-507 к хемолитоавтотрофному росту в присутствии сероводорода, что позволяет оценить их функциональную роль в антропогенных и природных сообществах.

ДВА ВИДА ЦИАНОБАКТЕРИЙ–ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ХЛОРОПЛАСТОВ, И МНОГООБРАЗИЕ ПЛАСТИД У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Стадничук И. Н.* , Кузнецов В. В.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, ifr@ippras.ru

*stadnichuk@mail.ru

Рассмотрена совокупность современных данных о роли цианобактерий в происхождении хлоропластов. В основе представлений о появлении клеточных форм жизни лежит концепция эндосимбиотического происхождения хлоропластов от цианобактерий. Ее создателем благодаря изучению диатомей стал в 1905 г., как общепризнано, русский биолог К. С. Мережковский. Развившаяся с тех пор клеточная теория базируется на данных филогеномики, феномене параллельного переноса генов и положении о формировании органелл в ходе клеточных симбиозов. Возникшее представление о двух клеточных царствах, бактерий и всех остальных организмов, сменилось делением на подцарства архей, эубактерий и эукариот с единым клеточным предком, обозначенным как LUCA. С появлением филогеномики и метагеномики сформировался новый двухдоменный сценарий, по которому в первичном архейно-эубактериальном сообществе благодаря синтрофии возникли условия появления эукариот. Согласно геохронологической шкале, от возникновения жизни 3,6–3,9 млрд лет назад до появления первых эукариот прошло 1,5 млрд. лет. Цианобактерии как прокариоты возникли 2,6 млрд лет назад, после появления фотосинтеза у анаэробных фотобактерий. Первые фотосинтетики-эукариоты появились 2,1 млрд лет назад, после кислородной биосферной катастрофы, спровоцированной цианобактериями, и за последующий 1 млрд. лет в ходе эндосимбиозов, названных первичными, дали линии красных, глаукофитовых и зеленых микроводорослей, совместно названных архепластидами. Их разная окраска обусловлена дополнительными к хлорофиллу антенными пигментами, а хлоропласты содержат две

наружные мембраны и имеют монофилетическое происхождение от предковой цианобактерии, родственной современному виду *Gloeomargarita*. Первичный симбиоз произошел затем еще раз 140 млн лет назад с цианобактерией из рода *Synechococcus*, дав фотосинтезирующих амёб рода *Paulinella*. Дальнейшие симбиозы возникали между гетеротрофными протистами и клетками архепластид, что привело к появлению четырехмембранных хлоропластов. Можно насчитать около 10 таксонов вторичносимбионтных микроводорослей, из них у динофлагеллят и эвгленовых число хлоропластных мембран редуцировалось до трех, а у части динофитовых хлоропласты стали результатом сериального вторичного и третичного эндосимбиоза, когда в ходе эволюции собственный хлоропласт утрачивался, а затем клетка-хозяин приобретала новый хлоропласт, не свойственный ее эукариотному статусу. Симбиотические отношения вышли за рамки «чистого» эндосимбиоза. Описаны случаи клептопластии хлоропластов, а также случаи полного подавления фотосинтеза, например, в клетках малярийного плазмодия и других паразитических и хищных одноклеточных. Эндосимбиоз – сложный процесс, в ходе которого происходит внутриклеточный параллельный перенос большей части хлоропластных генов в ядро клетки, а синхронизация их функций и активности происходит благодаря антероградному и ретроградному сигналингу. Симбиотические отношения, как ныне ясно, пронизывают, начиная с синтрофии ранних микроорганизмов, все процессы взаимодействий в экосистемах. К настоящему времени возникла симбиогенетика как новая биологическая дисциплина.

ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ВИНА

Танащук Т. Н., Шаламитский М. Ю., Загоруйко В. И.

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Ялта, magarach_microbiol.lab@mail.ru

В условиях технологического процесса виноделия могут развиваться только очень немногие группы микроорганизмов, среди которых важное место занимают молочнокислые бактерии (МКБ). Из всех процессов, вызываемых МКБ в вине, единственным полезным является яблочно-молочное брожение (ЯМБ), вопросы которого подробно отражены в литературе. В современной виноделии особая роль отводится проведению индуцированного ЯМБ с применением чистых культур МКБ. Надежность проведения такого процесса напрямую зависит от применяемых штаммов, основным критерием отбора которых является их высокая декарбоксилирующая активность.

Объектами исследования служили 23 штамма МКБ (9 штаммов *Oenococcus oeni*, 6 штаммов *Lactobacillus hilgardii*, 11 штаммов *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei*), выделенные на разных технологических стадиях приготовления вин из винограда, произрастающего в Крыму. Идентификацию изолятов проводили на основании анализа последовательности генов 16S рДНК.

При изучении способности штаммов МКБ усваивать L-яблочную кислоту применяли тест на яблочно-молочную активность не размножающихся делением клеток. Расчет потребления L-яблочной кислоты осуществляли по данным изменения массовой концентрации титруемой кислотности на основании предварительно проведенной математической обработки массива расчетных характеристик бинарных систем, максимально близких по содержанию к опытным вариантам сред.

Исследование показало, что активность сбраживания штаммами L-яблочной кислоты зависела как от видовой принадлежности штамма, так и от pH среды культивирования. Все штаммы вида *O. oeni* активно сбраживали L-яблочную кислоту, потребление которой в зависимости от штамма снизилось в среде с pH 3,2 в более широком диапазоне 35,3–75,3 % по сравнению с pH 4,0, при котором потребление штаммами L-яблочной кислоты составило 82,5–95,0 %. Активными кислотопонижателями проявили себя также штаммы вида *L. casei*/*paracasei*. Из 9 исследованных штаммов семь штаммов при pH 4,0 и пять штаммов при pH 3,2 активно усваивали L-яблочную кислоту до 78,8–87,5 % и 54,7–58,6 % соответственно. Из пяти штаммов вида *L. hilgardii* только для одного штамма отмечено снижение L-яблочной

кислоты в количестве 48 % (рН 4,0) и 19,2 % (рН 3,2). Остальные штаммы способность к потреблению L-яблочной кислоты не проявили. Отмечена зависимость между видовым составом МКБ и источником их выделения. Так, все штаммы видов *O. oeni* и *L. casei/paracasei* были выделены на этапе ферментации виноградного суслу и из молодых столовых и шампанских виноматериалов, т.е. на этапе прохождения яблочно-молочного брожения. Штаммы *L. hilgardii* выделены из вин, где их активность была связана с процессом молочно-кислого скисания.

В результате проведенного исследования получены новые знания о декарбокксилирующей способности природных штаммов МКБ, выделенных из виноградо-винодельческих зон Крыма, и для дальнейшей селекционной работы отобраны 7 штаммов *O. oeni* и 5 штаммов *L. casei/paracasei*, для которых потребление L-яблочной кислоты в среде с рН 3,2 составило более 50 %.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0833-2019-0008.

СОЗДАНИЕ ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* ПРОДУЦЕНТА β -КАРОТИНА

Таратынова М. О.^{1,*}, Косихина Ю. М.¹, Юзбашева Е. Ю.².

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва

²БиоКаи Инк, Калифорния

*mtaratynova@inbox.ru

Каротин является природным красителем, антиоксидантом и предшественником витамина А. Он применяется в косметической, медицинской, пищевой и кормовой промышленности. Аскомицетовые дрожжи *Yarrowia lipolytica* способны накапливать значительное количество ацетил-КоА — участника иницирующей реакции мевалонатного пути в биосинтезе терпенов (в том числе и β -каротина). Ранее нами был получен штамм дрожжей *Y. lipolytica* ВКПМ Y-4854 продуцирующий 24,0 мг/г сухого веса (406,9 мг/л) -каротина. Целью данного исследования является метаболическая инженерия штамма ВКПМ Y-4854, приводящая к дальнейшему повышению продукции -каротина.

Биосинтез -каротина штаммом дрожжей *Y. lipolytica* Y-4854 был усилен путем последовательного введения 6 модификаций, приводящих к гетерологичной или повышенной экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма: 1) ген *Y. lipolytica* *HMGR1*, кодирующий гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазу; 2) ген *Y. lipolytica* *ERG20*, кодирующий геранил/фарнезилдифосфатсинтазу; 3) ген *Y. lipolytica* *ERG12*, кодирующий мевалонаткиназу; 4) слитые гены *CarRP-GGPPs7*, где ген *CarRP* кодирует бифункциональный фермент фитосинтазу/ликопинсинтазу из *Mucor circinelloides*, а ген *GGPPs7* кодирует фермент геранилгеранилдифосфатсинтазу из *Synechococcus sp.*, 5) ген *Mucor circinelloides* *CarB*, кодирующий фитоендегидрогеназу; 6) слитые гены *CarRP-ERG20^{F88C}*, где *ERG20^{F88C}* модифицированный вариант геранил/фарнезилпирофосфатсинтазы. Финальный сконструированный рекомбинантный штамм был депонирован под регистрационным номером ВКПМ Y4950.

Наиболее сильно на продукцию -каротина повлияло введение слитых генов *CarRP-GGPPs7*, прирост в мг/г сухого веса составил 30%. Продукция β -каротина итоговым штаммом ВКПМ Y4950 при культивировании в 3 л ферментере составила к 89 часу 38,0 мг/г сухого веса и 2,4 г/л. При этом накопление биомассы составило 62,5 г сухого веса/л.

Таким образом, в ходе проделанной работы был сконструирован штамм ВКПМ Y4950 — продуцент β -каротина.

АНТИМИКРОБНАЯ И АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ТЕРПЕНОИДОВ

Тризна Е. Ю.^{1,*}, Махмуд Р.¹, Гатина А. Э.¹, Никитина Л. Е.², Каюмов А. Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, public.mail@kpfu.ru

²Казанский государственный медицинский университет, Казань

*trizna91@mail.ru

Введение

В связи с быстрым развитием устойчивости к антимикробным препаратам у патогенных микроорганизмов, в последние годы все чаще появляется необходимость поиска альтернативных способов борьбы с инфекциями, опосредованными различными видами бактерий и грибов. В настоящее время все чаще для терапии используют комбинацию нескольких антимикробных препаратов, для повышения их эффективности. Терпены были выделены из растительных масел, среди которых были выявлены соединения, обладающие антимикробной и противогрибковой активностью. Целью исследования было оценить антимикробную и противогрибковую активность миртенола против *S. aureus* и *C. albicans*.

Материалы и методы

Минимальную подавляющую концентрацию терпенов определяли методом серийных микроразведений. Для оценки возможности повышения производными миртенола эффективности других антимикробных агентов использовали метод шахматной доски.

Результаты и обсуждение

Была показана низкая антимикробная активность миртенола в отношении золотистого стафилококка и *C. albicans* по сравнению с другими антимикробными препаратами. Однако соединение обладает тропностью к мембранам что может повышать эффективность других антимикробных препаратов. Так в отношении планктонных клеток золотистого стафилококка, наблюдался синергизм миртенола+ с амикацином в отношении 75 % изолятов. Против бактерий в составе биопленки синергизм был установлен при сочетании миртенола с хлоридом бензалкония для половины исследуемых изолятов.

В отношении свободноплавающих клеток *C. albicans* был показан синергизм для 64 % штаммов в присутствии миртенола+ с флуконазолом и для 81% исследуемых штаммов в присутствии миртенола+ с хлоридом бензалкония. В случае клеток, погруженных в биопленку, сочетание миртенола с флуконазолом повышало эффективность фунгицида по отношению к половине исследуемых штаммов, а миртенола+ и хлорида бензалкония в отношении 72 % штаммов. Важно отметить что 6 штаммов, устойчивых к высокой дозе флуконазола, становились чувствительными к препарату в сочетании с миртенолом.

Заключение

Миртенол увеличивает антимикробную активность амикацина, флуконазола и бензалкония хлорида, облегчая их проникновение в клетку, следовательно, является перспективным соединением для борьбы с бактериальными и грибковыми инфекциями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №20-64-47014).

НОВАЯ ВОДОРОДИСПОЛЬЗУЮЩАЯ МЕТАНООБРАЗУЮЩАЯ АРХЕЯ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ ОСТРОВА ЗАПАДНЫЙ ШПИЦБЕРГЕН

Трубицын В. Э., Щербакова В. А.

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

adm@ibpm.ru

lichoradkin43@gmail.com

Перспективность исследования гидрогенотрофных метаногенов Арктики обусловлена тем, что они – потенциальный источник энергии в экстремальных условиях, модельные объекты для биотехнологии и астробиологии, механизмы адаптации к холодным условиям которых до сих пор не изучены полностью.

Целью работы было исследование с использованием методов классической микробиологии и молекулярной биологии нового водородиспользующего метаногена из постоянно холодной экосистемы.

Штамм метаногенных архей VT был выделен из образца вечной мерзлоты, отобранного вблизи п. Баренцбург на территории о. Западный Шпицберген (Норвегия) в конце 2018 г. Штамм был выделен на минеральной среде с добавлением формиата и H_2/CO_2 в качестве источников углерода и энергии с использованием метода десятикратных разведений с ванкомицином и стрептомицином.

Новый метаноген был способен расти на формиате (при оптимальной концентрации 5 г/л) и смеси H_2/CO_2 . Оптимальная температура роста – 20°C при температурном диапазоне от 10 до 36 °C. Оптимальный pH для роста составил 6,56 ед.

Рост штамма стимулировался добавлением в среду: казаминовых кислот (1 г/л), дрожжевого экстракта (1 г/л), жидкости рубца (10 мл/л), коэнзима М (0,07%) и триптиказы (1 г/л), добавление ацетата (1 г/л) на рост штамма не влияло. Максимальная скорость роста составляла 1,053 сут⁻¹, наименьший период удвоения составлял 0,95 суток.

Были получены нуклеотидная последовательность 16S рРНК (1205 н.п.) и аминокислотная последовательность С-концевого домена белка *mcrA* (167 АА). Филогенетический анализ показал, что штамм VT кластеризуется с представителями рода *Methanobacterium*, ближайшим к нему родственным штаммом является *M. lacus 17A1*^T с подобием последовательностей 16S рРНК и *mcrA* 97,02 и 97,6 % соответственно.

В настоящее время ожидается получение полного генома штамма VT и его сравнение с геномами близкородственных метаногенов, однако по уже имеющимся данным можно сделать вывод, что выделенный штамм, вероятнее всего, является представителем нового вида рода *Methanobacterium*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-34-90087.

ПРОДУКЦИЯ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЖЕЛЕЗА II НА АЭРОБНО РАСТУЩУЮ КУЛЬТУРУ *ESCHERICHIA COLI*

Тюленев А. В., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Leksey333@yandex.ru

Актуальность. В настоящее время отмечается большой интерес к изучению роли низкомолекулярных тиолов и серосодержащих соединений в регуляции устойчивости бактерий к различным стрессам, включая действие антибиотиков и окислительный стресс. Особый интерес представляет роль эндогенного и экзогенного сульфида водорода (H_2S) в регуляции гомеостаза цистеина при стрессовых воздействиях. Свободный цистеин способен вступать в реакцию Фентона в присутствии железа II, в результате чего образуются токсичные гидроксильные радикалы, повреждающие ДНК, белки и мембраны. Одним из способов поддержания низкого уровня цистеина – его деструкция с участием различных десульфидаз с образованием H_2S . С другой стороны, представляет интерес продукция сульфида бактериями в аэробных условиях при резком повышении уровня свободного железа II (Fe^{2+}) в среде культивирования.

Материалы и методы. Объект исследования: *Escherichia coli* BW25113 (родительский штамм) из коллекции Keio. Бактерии культивировали при 37 °C в колбах на орбитальном шейкере на среде M9 с глюкозой и неорганическим сульфатом в качестве единственного источника серы.

В культуру бактерий в середине логарифмической фазы роста вносили 100 мкМ Fe^{2+} (сульфат железа II). Продукцию сульфида водорода непрерывно определяли с помощью ио-

носелективного сульфид-специфического халькогенидного электрода цифровым ион-метром срХ-2 в режиме реального времени непосредственно в колбах с растущими *E. coli*.

Результаты и обсуждение. В нормальных условиях аэробного роста, количество продуцируемого клетками сульфида поддерживалось на постоянном уровне. При внесении в культуру бактерий 100 мкМ Fe²⁺ отмечалось резкое обратимое увеличение продукции эндогенного H₂S в течение 10 мин, о чем свидетельствовало падение потенциала сульфидного сенсора на 30 мВ (что соответствует 55 нМ), с последующим возвращением к базовому значению. Скорость роста бактерий при этом не изменялась. Ранее мы наблюдали такое же увеличение продукции сульфида при стрессах, связанных с резкой остановкой роста бактерий. В этих условиях наблюдалось повышение уровня внутриклеточного свободного цистеина, который подвергался деструкции с образованием сульфида, который регистрировался таким же способом.

В настоящей работе наблюдалась другая ситуация, при которой продукция H₂S происходила не при увеличении внутриклеточного цистеина, а при повышении уровня свободного Fe²⁺ в среде. Несомненно, что добавление в среду культивирования Fe²⁺ должно приводить к окислительному стрессу. Планируется изучить роль H₂S в этих условиях.

Выводы. При резком повышении количества Fe²⁺ в культуре бактерий *E. coli* происходит кратковременное увеличение продукции H₂S.

Работа поддержана грантами РФФИ № 19-04-00888 и грантом Президента РФ для молодых ученых МК-420.2020.4.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ПОГРУЖЕННЫХ В БИОПЛЕНКУ

Федорова М. С. , Миронова А. В., Тризна Е. Ю., Каюмов А. Р.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

**MaSFedorova97@mail.ru*

В настоящее время активный рост численности инфекционных заболеваний во всем мире связан с быстрым развитием антибиотикорезистентности. Одним из механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам служит их способность к образованию биопленок и разработка препаратов, способных к предотвращению и разрушению биопленок, является актуальной задачей. *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, будучи одними из самых распространенных патогенов, образуют смешанные биопленки, где проявляют взаимодействия как синергического, так и антагонистического характера. Нами ранее было показано, что внесение культуральной жидкости *S. aureus* подавляет жизнеспособность *P. aeruginosa*. Поэтому целью данной работы было выделить фракцию внеклеточных метаболитов *S. aureus*, активных в отношении клеток *P. aeruginosa*, погруженных в биопленку.

Добавление культуральной жидкости *S. aureus* приводило к гибели открепившихся клеток *P. aeruginosa* при разбавлении в 2 раза 50%, а клеток в биопленке при разбавлении в 4 раза. Так как у грам-положительных бактерий чаще всего секретируются антимикробные пептиды, подбирали оптимальные условия pH и температур для их выделения. В условиях повышенных температур (60 °C) наблюдалось снижение активности по сравнению с н.у. (37 °C), а закисление среды (pH3) не влияло на активность. Так как бактериоцины часто прикреплены к клеткам, проводили их отмывку с клеток *S. aureus* в глициновом буфере (25мМ pH 2.5). Для извлечения целевых метаболитов из полученных проб отмываемых клеток и культуральной жидкости, проводили ступенчатую твердофазную экстракцию с дальнейшей лиофильной сушкой. В результате наибольшая антимикробная активность наблюдалась при смывании проб 40% ацетонитрилом. Ультрафильтрация проб на PES-мембранах с отсечкой 3000 и 10000 кДа показала, что метаболиты находятся в диапазоне до 3000 кДа.

Дальнейшие исследования будут направлены на идентификацию данных метаболитов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (№20-64-47014).

АТФ-СИНТАЗА КАК РЕГУЛЯТОР ВЕЛИЧИНЫ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Фенюк Б. А.

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва
fenioug@fbb.msu.ru

АТФ-синтаза F-типа – один из ключевых ферментов биоэнергетики бактерий, сопрягающий синтез/гидролиз АТФ и трансмембранный транспорт протонов. У фотосинтетических и аэробных бактерий основной функцией фермента является синтез АТФ за счет мембранного потенциала протонов. При снижении этого потенциала реакция обращается, и фермент начинает генерировать мембранный потенциал за счет энергии гидролиза АТФ.

Существует несколько разных механизмов регуляции фермента, которые подавляют его АТФазную активность при снижении мембранного потенциала протонов. Физиологическая роль этих механизмов обычно трактуется, как способ сберечь внутриклеточный АТФ в условиях де-энергизации мембраны. Однако прямых экспериментальных подтверждений такой роли *in vivo* пока не получено.

В данной работе предлагается гипотеза и иллюстрирующая ее числовая модель, согласно которым вышеупомянутые регуляторные механизмы могут иметь иную физиологическую роль. Предполагается, что эти регуляторные механизмы могут препятствовать колебаниям мембранного потенциала протонов в ответ на изменение активности его первичных генераторов (ферментов фотосинтетической и дыхательной цепи), стабилизируя его на достаточно высоком уровне, и тем самым обеспечивая эффективную работу систем трансмембранного транспорта ионов и метаболитов, а также вращение жгутика. Числовая модель, реализованная на языке Perl, подтверждает данное предположение.

РОЛЬ СИСТЕМЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ЗАХВАТЕ ЭКЗОГЕННЫХ ХИНОНОВ КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Финкельберг И. А. М.¹, Галкина К. В.^{1,2}, Маркова О. В.², Кнорре Д. А.^{1,2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий связан с окислением и восстановлением хинона (CoQ). В клетках грибов нарушение биосинтеза хинонов компенсируется добавлением экзогенного CoQ6, что указывает на их способность захватывать и транспортировать хинон из среды во внутреннюю мембрану митохондрий. Однако многие синтетические производные хинонов (децилхинон, митохинон) не способны к такой «комплементации», несмотря на то, что они эффективно заменяют CoQ в дыхательной цепи изолированных митохондрий. Мы предположили, что это несоответствие объясняется ограничениями, которые накладывает на структуру хинона система внутриклеточного транспорта. Кроме того, активность ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью может препятствовать попаданию в клетку определенных производных хинонов. Чтобы проверить эти предположения, мы получили мутантный штамм пекарских дрожжей *S.cerevisiae* $\Delta coq1 \Delta pdr1 \Delta pdr3$. В этом штамме одновременно нарушен биосинтез хинонов (делетирован ген COQ1) и снижена активность ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью (делетированы два гена транскрипционных факторов PDR1 и PDR3 – активаторов ABC-переносчиков). Мы показали, что CoQ1 комплементирует рост клеток штамма $\Delta coq1$, но не $\Delta coq1 \Delta pdr1 \Delta pdr3$. Более того, добавление в среду децилхинона увеличивало скорость поглощения кислорода клетками штамма $coq1$, но не $coq1 pdr1 pdr3$. В то же время, добавление CoQ1 и децилхинона (но не CoQ6) приводило к увеличению содержания Pdr5p в клетках.

Кроме того, CoQ1 стимулировало откачивание флуоресцентного субстрата МЛУ-переносчиков Нильского красного. Наши данные указывают на то, что Pdr1p и Pdr3p регулируют экспрессию мембранных белков, необходимых для захвата CoQ1 из среды, или же снижают токсичность хинонов для клетки.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 18-14-00151.

СЕКРЕТИРУЕМАЯ ХОЛЕСТЕРИНОКСИДАЗА *NOCARDIOIDES SIMPLEX* ВКМ Ас-2033Д

Фокина В. В.*, Шутов А. А., Брагин Е. Ю., Донова М. В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина
РАН, ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино
*fokina@ibpm.pushchino.ru

Холестериноксидаза (ХО) – один из ключевых ферментов в метаболизме холестерина, катализирующий окисление холестерина до холест-4-ен-3-она с восстановлением кислорода до перекиси водорода. ХО широко применяется в клинической диагностике – для определения общего холестерина в сыворотке крови, в пищевой промышленности – для детекции растительных стероидов в пищевых продуктах, а также в биотехнологии и биомедицинских исследованиях. Высокая практическая значимость ХО вызывает необходимость поиска новых штаммов-продуцентов ХО и изучения функциональных свойств синтезируемых ферментов.

Ранее мы секвенировали и аннотировали геном почвенного непатогенного штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д, выявили кластеры генов, относящихся к катаболизму стероидов; на основании транскриптомных профилей культур *N. simplex*, выращенных в различных условиях индукции, выявили гены, кодирующие ферменты катаболизма стероидов. В геноме штамма Ас-2033Д обнаружены несколько генов, кодирующих потенциальные ХО с ковалентно связанным кофактором ФАД (*KR76_07670*) и с нековалентным связыванием кофактора ФАД (*KR76_01200*, *KR76_06800*, *KR76_0955* и *KR76_13200*). Ни один из перечисленных генов, за исключением *KR76_09550*, не индуцировался холестерином. В настоящей работе изучали функциональные свойства секретируемой ХО (*KR76_0955*) штамма Ас-2033Д.

Культуру *N. simplex* растили, как описано ранее, биомассу отделяли центрифугированием, полученный супернатант фильтровали через мембранный фильтр (0,2 мкм). Бесклеточный супернатант тестировали на активность в отношении 3 β -гидроксистероидов: дегидроэпиандростерона (ДГА), холестерина (Х), фитостерина (Ф), прегненолона (П), 5 α -Н-холестанола (5 α НХ). Стероиды анализировали методом ВЭЖХ, структуру 5 α Н-холестанола подтверждали с помощью ¹Н ЯМР и ¹³С ЯМР. Для оценки сходства ХО (*KR76_0955*) *N. simplex* Ас-2033Д с другими микробными ХО использовали BLAST.

Содержащаяся в бесклеточной жидкости *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д ХО осуществляла биоконверсию Х, 5 α НХ, Ф, П и ДГА с образованием холестенона (94 %), 5 α Н-холестанола (93 %), фитостенонов (63 %), прогестерона (< 4 %), андростендиона (4 %), соответственно. Максимальное сходство (62%) ХО (*KR76_0955*) имеет с ChoE *Rhodococcus equi*, минимальное (15–23 %) – с ХО микобактерий (*M. leprae* ChoD, *M. tuberculosis* H37Rv ChoD, *M. marinum* ChoD); сходство с ХО штаммов стрептомицетов не превышало 47–48 %.

Высокая функциональная активность секретируемой ХО *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д, сопоставимая с активностью коммерческих ХО из стрептомицетов, а также ее специфичность в отношении различных стероидов определяют высокий потенциал данного фермента для практического применения в различных областях биотехнологии и биомедицины.

Работа поддержана Российским научным фондом (Проект 21-64-0024).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ Г. МУРМАНСКА В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Фокина Н. В.^{*}, Корнейкова М. В., Сошина А. С., Мязин В. А.

Институт проблем промышленной экологии Севера — обособленное подразделение
ФИЦ «Кольский научный центр РАН», Апатиты
*nadezdavf@yandex.ru

В настоящее время подавляющее большинство водоемов подвержено антропогенному воздействию, что нарушает естественное равновесие между абиотическими и биологическими компонентами водной среды. Цель работы — оценка микробиологического состояния водных объектов урбанизированных территорий Арктической зоны в условиях нефтяного загрязнения.

Отобраны образцы донных отложений и воды озер г. Мурманска, проведен анализ содержания нефтепродуктов методом ИК-спектрометрии на анализаторе АН-2. Образцы для микробиологических исследований неглубоких озер (до 5 м) были взяты в верхнем слое, более глубоких озер — в верхнем и придонном слоях. Так же исследовались образцы донного ила.

В качестве показателей эколого-микробиологического состояния исследуемых водоемов были выбраны численность сапротрофных и олиготрофных бактерий, общая численность микроорганизмов и их биомасса, кишечная патогенная флора; численность и видовое разнообразие культивируемых микромицетов. Микробиологические анализы выполнены общепринятыми стандартными методами.

Донные отложения озер Окуновое, Среднее, Семеновское и Северное характеризуются как слабозагрязненные, донные отложения озера Ледовое — как опасно загрязненные. Установлено превышение нормативов содержания нефти и нефтепродуктов для водоемов рыбохозяйственного значения в воде озера Ледовое и в поверхностном слое воды озера Южное.

Микробиологические исследования выявили, что численность бактерий в воде озер г. Мурманска невысокая, максимальные значения были отмечены в оз. Ледовое и Южное. Наибольшее количество грибов выявлено в оз. Семеновское, наименьшее — в оз. Окуновое. Численность микроорганизмов в донных отложениях озер на два, три порядка выше по сравнению с водной толщей. По показателю общей численности бактерий все озера относятся к олиготрофному или мезотрофному типу, по показателю коэффициента сапробности и санитарно-микробиологическим характеристикам — к чистым, за исключением оз. Ледовое. Из воды и донных отложений озер выделено 11 и 9 видов микромицетов, принадлежащих к рр. *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*. Как в воде, так и в донных отложениях всех озер выявлены условно-патогенные виды грибов, принадлежащие к группе BSL-2. Доминант — *Paecilomyces variotii*. Наихудшей санитарно-микробиологической обстановкой характеризовались оз. Среднее и Окуновое для воды и оз. Ледовое, Семеновское и Северное для донных отложений.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *YARROWIA LIPOLYTICA* 212 И *YARROWIA LIPOLYTICA* 672

Французова Е. Э.^{1,3,*}, Лаптев И. А.², Кочаровская Ю. Н.^{1,3}, Делеган Я. А.³

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, rector@pushgu.ru

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатowski институт», Москва, vkpm@genetika.ru

³ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушино, adm@ibpm.ru
*katkaty235@gmail.com

Альфа-кетоглутаровая кислота (α -кетоглутарат) участвует в цикле трикарбоновых кислот и является самым важным акцептором аминокрупп в реакциях переаминирования, имеет

широкое коммерческое значение, применяется в промышленности, пищевой и медицинской областях. Микробиологический синтез α -кетоглутарата имеет более высокую селективность к продукту, низкую токсичность, а также низкую стоимость, что говорит об экономических и экологических преимуществах перед химическим синтезом. Дрожжи *Y. lipolytica* способны секретировать большое количество органических кислот, тип и количество которых зависят от штамма и условий культивирования.

Цель исследования – увеличение продукции α -кетоглутарата в штаммах *Y. lipolytica* 212 и *Y. lipolytica* 672 за счет сверхэкспрессии гена, кодирующего изоцитратдегидрогеназу IDP1.

Максимально высокий уровень продукции α -кетоглутарата можно достичь за счёт повышения копииности клонируемых генов. Для *Y. lipolytica* используется система отбора множественных интегрантов в область последовательности Zeta. Получены варианты штаммов 212 и 672, дефектные по гену *ura3* (212 Δ ura3, 672 Δ ura3). Получена плаزمида для экспрессии гена IDP1, сконструированы синтетический и нативный промотор. Выполнена трансформация штаммов 212 Δ ura3 и 672 Δ ura3 с помощью фрагментов плазмид, экспрессирующих ген IDP1.

Далее будет осуществлен скрининг трансформантов посредством оценки продукции альфа-кетоглутаровой кислоты на минимальной среде с лимитом по тиамину при низких значениях pH. После ферментации штаммов в колбах будет выбран наиболее эффективный вариант для изучения продукции α -кетоглутарата в ферментере. Количество копий гена в выбранном мутантном варианте будет оценено после полногеномного секвенирования.

В результате работы будет получен рекомбинантный штамм – эффективный продуцент α -кетоглутарата. Штамм планируется применять для наработки α -кетоглутарата в полупромышленных объёмах.

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *kstD2* ИЗ *NOCARDIOIDES SIMPLEX* ВКМ Ас-2033Д В КЛЕТКАХ МИКОЛИЦИБАКТЕРИЙ

Фуфаева С. Р., Ивашина Т. В., Довбня Д. В., Шутов А. А., Донова М. В.

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, sfufaeva@list.ru

Введение двойной связи в кольцо А стероидного ядра является одной из ключевых стадий в производстве стероидов прегнанового ряда. Актинобактерии *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д эффективно осуществляют реакцию 1(2)-дегидрирования 3-кетостероидов, при этом в геноме штамма идентифицировано 5 генов предполагаемых 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназ с различными уровнями экспрессии. Из них только ген *kstD2* (KR76_27125) увеличивал экспрессию в ответ как на фитостерин (в 6,4 раза), так и на 21-ацетат кортизона (в 1208 раз – максимальный уровень индукции среди всех генов). Цель данной работы – гетерологическая экспрессия и подтверждение 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназной функции фермента, кодируемого геном *kstD2* из *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д.

Ген *kstD2* из *N. simplex* клонировали в плаزمиды pSMT3-MN и pMVT61 под контролем *hsp60* и ацетамидазного промоторов, соответственно. Рекомбинантные плазмиды вводили методом электропорации в клетки штамма *Mycolicibacterium neoaurum* NRRL B-3805 Δ *kstD*, не имеющего собственной 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназной активности. Показано, что в отличие от pMVT61_*kstD2*, плаزمида pSMT3-MN_*kstD2* проявляет структурную нестабильность в клетках миколицибактерий. Полученный штамм *M. neoaurum* B-3805 Δ *kstD*/pMVT61_*kstD2* использовали в экспериментах по биотрансформации стероидных субстратов.

Биотрансформацию гидрокортизона проводили покоящимися клетками миколицибактерий, индуцированными ацетамидом. В качестве контролей использовали родительский штамм или тот же штамм, несущий плазмиду pMVT61 без вставки. Рекомбинантный штамм накапливал 1(2)-дегидрированные продукты (преднизолон и его 20-восстановленный аналог) с мольным выходом 51,3 % после 96 часов инкубации. При биотрансформации гидрокортизона в присутствии менадиона, ингибирующего реакции восстановительного характера, наблюдали полное превращение субстрата с максимальным мольным выходом

преднизолона 72,2 % после 96 часов инкубации. Рекомбинантный штамм также проявлял целевую 1(2)-дегидрогеназную активность в отношении синтетического субстрата 6 α -метил-гидрокортизона. В контрольных вариантах накопления 1(2)-ненасыщенных стероидов не наблюдали.

При биотрансформации фитостерина оценивали способность растущей культуры *M. neoaurum* к 1(2)-дегидрированию 3-кетостероидных продуктов неполного окисления стерина. Родительский штамм конвертировал стерины исключительно в 1(2)-насыщенные продукты, преимущественно в андрост-4-ен-3,17-дион (АД) и 20-гидроксиметил-прегн-4-ен-3-он (ГМП). Рекомбинантный штамм сохранил способность к неполному окислению стерина, а также приобрел 1(2)-дегидрогеназную активность и накапливал соответствующие стероидные 1(2)-дегидроаналоги: андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД) и 20-гидроксиметилпрегна-1,4-диен-3-он (ГМПД).

Таким образом, получен новый штамм *M. neoaurum* В-3805 Δ *kstD*/pMVT61_*kstD2*, экспрессирующий функциональную 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназу *KstD2* из *N. simplex*. Штамм способен *in vivo* конвертировать гидрокортизон, 6 α -метил-гидрокортизон и продукты деградации боковой цепи стерина в соответствующие 1(2)-дегидроаналоги.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 21-64-00024).

НОВЫЙ ГАЛОФИЛЬНЫЕ ИЗОЛЯТЫ РОДОВ *HALOMONAS* И *VIRGIBACILLUS* (РЕСПУБЛИКА ДАГЕСТАН)

Халилова Э. А., Исламмагомедова Э. А., Абакарова А. А., Аливердиева Д. А.

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДФИЦ РАН
Махачкала, eslanda61@mail.ru

Дагестан является уникальной природной провинцией России, обладает многообразием природных ландшафтов благодаря влиянию тектонических процессов, эрозийной деятельности текущих вод, трансгрессивной и регрессивной динамике Каспийского моря, засушливому климату. Целью настоящей работы было молекулярно-таксономическое исследование и биотехнологический потенциал изолированных галофильных бактерий из термальных высокоминерализованных Берикейского и Тарумовского озер; солончаковых почв Прикаспийской низменности. С использованием микробиологических методов и анализа генов 16S рРНК идентифицированы денитрифицирующие бактерии родов *Halomonas* и *Virgibacillus*. Выявлен новый вид *Halomonas* sp. G2 (MW386470) с 95 % уровнем сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Штамм G2 – экстремальный галофил, способный расти в диапазоне 5–25 % NaCl (оптимум 25 %) и образовывать каротиноидный пигмент; мезофилл; нейтрофил; хемолитотроф; редуцирует нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; каталазо-, амилазо-, протеазо- и -галактозидазоположительный; липазо-, оксидазо- и уреазоотрицательный. Не способен гидролизовать инозит, индол; продуцирует лизин, желатин, эктоин; в качестве источника углерода и энергии использует цитрат и малат натрия; не продуцирует орнитин, H₂S и кислоту из D-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме лактозы и D-глюкозы. Восприимчив к триметоприму, ципрофлоксацину, офлоксацину, канамицину, ванкомицину, рифампицину, цефуроксиму, ампициллину, цефтазидиму, фосфомицину, кларитромицину, цефепиму, цефаклору. Содержание G+C в ДНК 67,3 %. Отличительной характеристикой изолята являлось продуцирование промышленно значимых гидролитических ферментов: амилазы, протеазы, -галактозидазы и каталазы при концентрации 25 % NaCl в среде. Остальные изоляты *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473) имели высокую степень сходства (100 %) с типовыми штаммами *H. elongata* DSM 2581T и *V. salinarius* DSM 18441T; содержание G+C в ДНК составляло 65,8, 66,5, 42,8 и 37,3 % соответственно. Штаммы имели высокий биотехнологический потенциал при концентрации NaCl в среде 5 и 25 %.

Полученные данные расширили представление о разнообразии и экологическом значении денитрифицирующих бактерий в функционировании засушливых экосистем и выявлении штаммов, продуцирующих ферменты промышленного значения.

НОВЫЕ БАКТЕРИИ–СИМБИОНТЫ ЦИТОПЛАЗМЫ ИНFUЗОРИЙ *PARAMECIUM BURSARIA* В КОНКУРЕНЦИИ ЗА ХОЗЯИНА

Чекрыгин С. А.¹, Пенькова Е. В.^{1,*}, Лебедева Н. А.², Колос В.¹, Flemming F. E.³,
Schrallhammer M.³, Потехин А. А.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра микробиологии, penkova-16@mail.ru;

²Санкт-Петербургский государственный университет, Ресурсный Центр «Культивирование микроорганизмов»

³Microbiology, Institute of Biology II, University of Freiburg, Freiburg, Germany
*penkova-16@mail.ru

Введение и цель работы. Симбиозы между инфузориями и бактериями часто встречаются в природе. Помимо специализированных симбионтов, инфузории также обладают собственным микробиомом. Многие инфузории, среди которых одним из наиболее изученных видов является *Paramecium bursaria*, также часто содержат в цитоплазме одноклеточные зеленые водоросли. Взаимоотношения между микроорганизмами, колонизирующими одну и ту же клетку хозяина, пока практически не изучены. Задачей данной работы была характеристика морфологическими и молекулярными методами неизвестного цитоплазматического симбионта инфузории *P. bursaria* и исследование стабильности комплексной симбиотической ассоциации.

Материалы и методы. В цитоплазме клеток выделенного в Ленинградской области клона N3-1 инфузории *P. bursaria* были выявлены неизвестные крупные бактерии, которые соседствовали с микроводорослями. С помощью секвенирования генов 16S рРНК и 18S рРНК соответственно была определена таксономическая принадлежность обоих симбионтов. Кроме того, была проведено метагеномное секвенирование клона N3-1 на платформе Illumina и определены компоненты микробиома парамеции. Для верификации результатов симбиотические бактерии в клетках инфузорий детектировали с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) со специфичными зондами.

Результаты и обсуждение. Обнаруженные в клетках клона N3-1 крупные бактериальные симбионты образовывали большие скопления в цитоплазме, которые сохранялись как агрегаты и при разрушении инфузории. Бактерии обладали способностью заражать клетки других клонов *P. bursaria*. Эти симбионты, представляющие новый род семейства *Holosporaceae*, находились в антагонистических отношениях с микроводорослями *Micractinium conductrix*. Однако при удалении водорослей с помощью циклогексимида оказалось, что и первичные бактериальные симбионты после такой обработки могут уступить свое место бактериям *Flavobacterium* sp. из микробиома парамеции. Первичные и вторичные симбионты могут некоторое время одновременно присутствовать в клетках *P. bursaria*. Таким образом, сразу несколько микроорганизмов конкурируют в борьбе за цитоплазму инфузории-хозяина.

Заключение.

– Впервые описан представитель нового рода бактерий семейства *Holosporaceae*, являющийся малоинфекционным цитоплазматическим симбионтом инфузорий *Paramecium bursaria*.

– Впервые показано, что представители рода *Flavobacterium* (Bacteroidetes, Flavobacteriaceae) могут быть внутриклеточными симбионтами инфузорий.

– Клетка *Paramecium bursaria* представляет собой сложную динамичную симбиотическую ассоциацию нескольких микроорганизмов, взаимоотношения между которыми являются конкурентными.

Поддержано грантом РФФ 20-14-00220.

ПСИХРОФИЛЬНЫЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ СИМБИОНТЫ ИНФУЗОРИИ *PARAMECIUM CAUDATUM*

Чекрыгин С. А.^{1,*}, Лебедева Н. А.², Потехин А. А.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра микробиологии, tchekrygin.sergej@yandex.ru;

²Санкт-Петербургский государственный университет, Ресурсный Центр «Культивирование микроорганизмов»

*tchekrygin.sergej@yandex.ru

Актуальность и цель работы. История изучения бактерий-симбионтов инфузорий *Paramecium* началась более ста лет назад, и разнообразие бактерий, населяющих клетки парамеций, продолжает расти. В основном эти бактерии относятся к семействам *Holospiraceae* и *Rickettsiaceae*. Мы обнаружили неизвестные симбиотические бактерии в цитоплазме *P. caudatum*, выделенных из городского пруда в Таллине (Эстония). Оказалось, что эти бактерии могут поддерживаться в клетках хозяев только при температуре +10–12 °С. Целью работы было определение таксономической принадлежности новых симбионтов и установление роли температурного фактора в поддержании симбиотической ассоциации.

Материалы и методы. Новых симбионтов изучили с помощью световой микроскопии, исследовали устойчивость симбиоза при разных температурах, проверили их инфекционность и охарактеризовали с помощью «полного цикла рРНК». Тотальную ДНК, выделенную из содержащих симбионтов клеток клона *P. caudatum* ЕТа1-14, использовали как матрицу для ПЦР фрагмента гена 16S рРНК. Продукты ПЦР клонировали и секвенировали. Для подтверждения принадлежности полученной последовательности изучаемым бактериям на клетках инфузорий, содержащих симбионтов, проводили FISH со специфичным зондом.

Результаты и обсуждение: Цитоплазматические симбионты клона ЕТа1-14 *P. caudatum* - палочковидные мелкие грамотрицательные бактерии, образующие большие скопления в цитоплазме клетки-хозяина. К движению эти бактерии не способны. В популяции хозяев постоянно происходят флуктуации численности и распространённости симбионта. Было обнаружено, что симбионты утрачиваются при температуре +16 °С и выше. Интересно, что термочувствительность демонстрировали не только симбионты, но и инфузории-хозяева, погибавшие при повышении температуры после быстрой спонтанной потери симбионтов.

Молекулярно-филогенетический анализ гена 16S рРНК показал, что исследуемые симбионты представляют новый род и относятся к ветви так называемых «быстро эволюционирующих *Holospiraceae*», куда также входят несколько цитоплазматических симбионтов других видов *Paramecium*. Все эти бактерии характеризуются способностью образовывать агрегаты в цитоплазме инфузорий-хозяев и малой инфекционностью. Симбионты клона ЕТа1-14 в результате экспериментального заражения успешно колонизировали клетки другого клона *P. caudatum*.

Заключение:

Обнаруженные цитоплазматические симбионты инфузорий *Paramecium caudatum* относятся к новому роду бактерий семейства *Holospiraceae*.

Симбиотические системы, образованные *Paramecium caudatum* и исследованными бактериями, не могут поддерживаться стабильно при температуре +16 °С и выше, при этом температура неблагоприятно воздействует и на симбионтов, и на хозяина.

Симбионты способны к горизонтальному расселению в популяциях инфузорий-хозяев. Поддержано грантом РФФИ 20-14-00220.

ЭВОЛЮЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ

Червонцева З. С., Ходжаева Е. С., Гельфанд М. С.

Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича
РАН (ИППИ РАН), Москва
z.chervontseva@iitp.ru

Введение

Гены, кодирующие ферменты одного метаболического пути, часто ко-локализованы в бактериальных геномах. Ко-локализация повышает вероятность того, что в случае горизонтального переноса гены одного пути будут перенесены вместе, и новый хозяин получит новую функцию. Однако разные метаболические пути в разной степени склонны формировать единый стабильный локус, а для одного пути степень ко-локализации может значительно отличаться в разных группах бактерий. В этой работе мы рассмотрели пути синтеза аминокислот, нуклеотидов и некоторых кофакторов и выявили группы генов, предпочитающих ко-локализоваться в девяти бактериальных филумах. Эти группы генов мы рассмотрели с точки зрения их биохимических функций. В частности, мы показали, что линейные пути, как правило, больше ко-локализованы, чем разветвленные, а больше всего в каждом пути ко-локализуются гены, кодирующие ферменты соседних реакций.

Материалы и методы

Были выбраны 18 путей синтеза аминокислот, витаминов и нуклеотидов. Для каждого пути были выписаны EC-номера составляющих их ферментов из базы данных MetaCyc. EC-номера были распространены по гомологии на 3524 геномов бактерий, принадлежащих девяти филумам: Firmicutes, Actinobacteria, Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- и Epsilonproteobacteria, Bacteroidetes и Cyanobacteria. Каждому гену был приписан его локус. Локус определялся как группа генов, связанных цепью генов, в которой длина межгенных областей не превышает 200 нуклеотидов. Восстановление эволюционной истории производилось при помощи программы tHMM.

Результаты

Для каждого пути в каждой группе организмов был построен граф, вершинами в котором являются гены входящих в него ферментов, а толщина ребер соответствует частоте, с которой пара генов оказывается в одном локусе. Был проведен сравнительный анализ связанных компонент этих графов и восстановлены наиболее вероятные графы для общего предка всех бактерий.

Выводы

Гены одного метаболического пути ко-локализуются чаще, чем гены разных путей. Линейные пути расположены более компактно, чем разветвленные.

Организмы разных групп имеют разную склонность к ко-локализации метаболических путей. Больше всего гены одного пути ко-локализованы у Firmicutes, а меньше всего у Cyanobacteria.

Гены, кодирующие белки соседних в пути реакций, значимо чаще ко-локализованы, чем гены на расстоянии одной и более промежуточной реакции.

У общего предка бактерий из рассмотренных филумов гены каждого пути с большой вероятностью ко-локализовались друг с другом.

МАЛЫЙ БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА ALIBPA ИЗ МИКОПЛАЗМЫ ACHOLEPLASMA LAIDLAWII СПОСОБЕН ПРЕДОТВРАЩАТЬ ОБРАЗОВАНИЕ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР

Чернова Л. С.*, Каюмов А. Р.

Казанский Федеральный (Приволжский) университет, г. Казань, Россия
*LSCh-888@live.com

Белки теплового шока (БТШ) подавляют агрегацию широкого спектра целевых белков. Нарушение работы БТШ связано с различными нейродегенеративными заболеваниями, устойчивостью к противомикробным препаратам и образованием бактериальных биопленок.

В данной работе была исследована способность малого БТШ AlIbpA из фитопатогенной микоплазмы *Acholeplasma laylawii* влиять на процесс образования биопленок и амилоидных структур.

Для этих целей были использованы штаммы *Escherichia coli* BL21 с делецией собственных БТШ ($\Delta EclbrA$, $\Delta EclbrB$, $\Delta EcdnaK$ и $\Delta EcSlpB$), способные экспрессировать как полноразмерный $A/lbrA$, так и $A/lbrA$ с делециями предполагаемых функциональных N- и C- концевых мотивов ($A/lbrA\Delta N12$, $A/lbrA14\Delta C14$). Окрашивание биопленок кристаллическим фиолетовым показало, что делеция любого БТШ приводит к образованию плотных биопленок клетками *E. coli*. Для оценки образования амилоидов штаммы *E. coli* выращивали на среде с красителями Тиофлавин S и Конго красный. Удаление одного из физиологических БТШ *E. coli* приводит к усиленному образованию амилоидных структур, что также было подтверждено поперечной микроскопией колоний. Повышенный уровень амилоидов наблюдался во время сверхэкспрессии $A/lbrA\Delta N12$ в $\Delta EclbrA$ и $A/lbrA\Delta C14$ в клетках $\Delta EclbrB$ соответственно. Амилоиды также были обнаружены во время сверхэкспрессии $A/lbrA\Delta N12C14$ в любом мутантном штамме.

Таким образом, мы предполагаем, что БТШ контролируют амилоидогенные процессы; сверхэкспрессия $A/lbrA$ может компенсировать недостаток $EclbrA$, значительно уменьшая количество амилоидов в матриксе, и для этого требуется его N-концевой мотив.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Проект № 20-34-90066).

IT'S TIME TO UNDERSTAND HUMANITY, WHY FIRES IN FORESTS.

Chikov V. I.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics. FRC Kazan Scientific Center of RAS. Russia
vichikov@bk.ru

The main reason for the increased fire hazard of forests in the world is that mankind immensely uses mineral fertilizers in agriculture around the globe. These fertilizers (primarily nitrates) are blown up by the wind with dust into the air and get inside the leaves of trees. This is worse than elevated root nitrates in the soil. The fires themselves in the forests occur as a result of a decrease in the root supply of trees (Fig.).

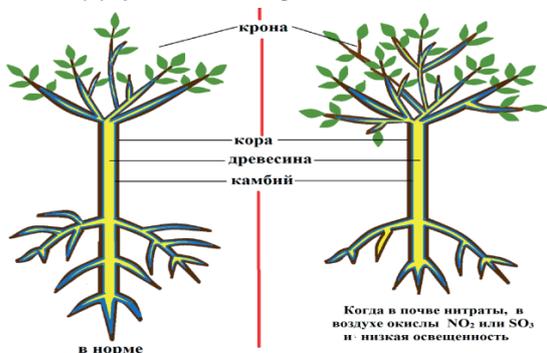


Рис. Масса корня/крона листьев деревьев



Nitrates acidify the extracellular solution inside the leaves and activate the enzyme invertase. Hydrolysis of sucrose, enhanced by the action of invertase, prevents its export from leaves to roots to enhance their growth. In this case, the roots cannot provide water for the entire section of the tree trunk. The root supply of the plant decreases and the amount of absorbed water becomes insufficient to fill the vessels of dead wood. And it dries up. This is clearly seen in the photo from the Internet of a burning tree in Australia (Photo). The dry wood inside the tree burns, but the bark does not burn. To eliminate this phenomenon, it is NECESSARY:

When opening leaves every spring, spray the crowns of trees early in the morning during dew with complex compounds $\{[Cu Zn (NH_4)_4] m \cdot Am\}$ - (ammonia) in a concentration (10⁻⁵-6 M). Their cost is negligible. For the synthesis of this drug, it is necessary to dissolve copper and zinc carbonates in ammonia. The main cost is spraying the trees. But the increased export of photosynthetic products from leaves to roots will continue throughout the season. As a result, the mass of new roots and their water-absorbing zone will increase. To verify the correctness of this measure, you can find

in trees treated with ammonia an increased moisture of dead xylem inside the tree trunk. The mass of the absorption zone of the roots of the tree will be greater. The water availability of the whole tree will increase, and the fire hazard will decrease. If you do this systematically, the fires in your forests will soon disappear. Try it and see.

РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ТЕХНОГЕННЫХ СУБСТРАТАХ И ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ КОЛЬСКОЙ АРКТИКИ

Шалыгина Р. Р. , Редькина В. В.*

Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН, Апатиты
regina_rinat@mail.ru

В настоящий момент актуальным направлением современной микробиологии является изучение распространения и свойств микроорганизмов экстремальных местообитаний. Однако, практически отсутствуют сведения о прокариотических и эукариотических фототрофных микроорганизмах в техногенных субстратах и загрязненных почвах в условиях Кольской Арктики. Цель настоящего исследования состояла в анализе таксономического состава цианобактерий и микроскопических водорослей в антропогенно-нарушенных экосистемах Кольского Севера.

Для альгологического анализа были взяты образцы почв, загрязненных выбросами Кандалакшского алюминиевого завода (г. Кандалакша), медно-никелевых комбинатов «Печенганикель» (п. Никель) и «Североникель» (г. Мончегорск), с нефтезагрязненных территорий (почвы на месте бывшего воинского подразделения, располагавшегося на г. Каскама), а также образцы техногенных субстратов (золошлакоотвалы Апатитской ТЭЦ, хвосты обогащения апатит-нефелиновый руды). Для исследования таксономического состава цианобактериально-водорослевых ценозов использовали метод посева почвенного мелкозема или почвенной суспензии на агаризованную среду. Видовую идентификацию проводили культурально-морфологическими и молекулярно-генетическими методами.

В обследованных почвах и субстратах обнаружено 142 вида эукариотических водорослей и цианобактерий, относящихся к 98 родам, 9 классам, 4 отделам. По числу видов преобладают водоросли из отдела Chlorophyta классов Chlorophyceae и Trebouxiophyceae. К наиболее часто встречающимся видам можно отнести: *Neocystis brevis*, *Chloroidium saccharophilum*, *Leptosira* cf. *obovata*, *Pseudococcomyxa simplex*, *Stichococcus bacillaris*, *Interfilum terricola*, виды рода *Chlamydomonas*, *Desmonostoc muscorum*. Большинство из них – типичные почвенные микрофототрофы, широко распространенные в почвах всего мира. Представители этих таксонов проявляют наибольшую устойчивость к стрессовым факторам природного и антропогенного характера.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 20-74-00108.

ГЕНЫ *RHLA* И *SPFO* И СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ К СИНТЕЗУ БИОСУРФАКТАНТОВ

Шапиро Т. Н., Лобакова Е. С.

МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, floyd52@rambler.ru

Углеводородоокисляющая активность микроорганизмов часто сопряжена со способностью к синтезу биоПАВ, которые повышают доступность углеводородов (УВ) для клеток микроорганизмов [Коронелли, Нестерова, 1990; Назина и др., 2003]. Рамнолипиды являются одними из наиболее изученных биоПАВ, что связано с их использованием для повышения нефтеотдачи пластов [Youssef et al. 2013; Zhao et al. 2016] благодаря их эмульгирующим свойствам [Amani et al. 2013]. Это наиболее эффективная группа биосурфактантов по способности снижать межфазное натяжения нефть–вода [Amani, Mehrnia 2010]. Целью работы

было установить наличие гена *RhlA* и способность штаммов углеводородоокисляющих бактерий (УОБ) к продукции ПАВ.

Детекцию генов *RhlA* и *spf0* проводили с помощью ПЦР согласно параметрам, описанным Schmidberger et al., 2013 и Sekhon et al., 2011, соответственно. Индекс эмульгирования (ИЭ) УОБ определяли методом Купера и Голденберга [Cooper, Goldenberg, 1987]. Измерение поверхностного натяжения (ПН) культуральной жидкости проводили методом Вильгельми [Щукин и др., 2004].

Все штаммы грамотрицательных бактерий, в составе выделенного ранее сообщества УОБ из образца топлива ТС-1 [Шапиро и др., 2018], характеризуются наличием гена *RhlA*, отвечающего за синтез биосурфактантов рамнолипидной природы. Все штаммы грамположительных бактерий, кроме *Rhodococcus* sp. Bi10, содержит ген *spf0*, отвечающих за синтез биосурфактантов липопептидной природы. При измерении физико-химических показателей, регистрация которых свидетельствует о способности к синтезу клетками ПАВ разного типа, показано, что штамм *Deinococcus* sp. Bi7 имел самый высокий ИЭ. Штаммы УОБ рода *Sphingobacterium* и штамм *A. faecalis* Bi3 имели показатели ИЭ более 50 %. Среди штаммов бактерий рода *Rhodococcus* только штамм *Rhodococcus* sp. Bi4 имел ИЭ ($53,3 \pm 3,2$ %). Значение этого показателя выше 40 % свидетельствуют об активности микроорганизмов в отношении синтеза биоПАВ, как и снижение показателя ПН более чем на 10 мН/м [Francy et al., 1991; Григорьян, 2004]. Штамм *S. multivorum* Bi2 снижал показатель ПН среды более чем на 21 мН/м. Штаммы *Sphingobacterium* sp. Bi8 и *A. faecalis* Bi3 также значительно уменьшали данный показатель. Другие штаммы УОБ – *Rhodococcus* sp. Bi4, *Rhodococcus* sp. Bi10, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Deinococcus* sp. Bi7 уменьшали поверхностное натяжение среды в среднем на 5–15 мН/м. То есть, максимальный ИЭ, отражающий продукцию бактериями внеклеточных биосурфактантов обнаружен у штамма *Deinococcus* sp. Bi7, а показатель гидрофобности, свидетельствующий о наличии у бактерий биосурфактантов, связанных с клеточной стенкой, у штамма *Sphingobacterium* sp. Bi5. Штаммы грамотрицательных бактерий, значительно снижавшие ПН, при этом содержали ген, ответственный за синтез рамнолипидов, что делает данные штаммы особенно важными для использования в биоремедиации, ввиду их способности синтезировать внеклеточные биосурфактанты.

Таким образом, мы проанализировали ИЭ и ПН выделенных штаммов УОБ и установили, что наибольшей способностью к синтезу биосурфактантов обладают штаммы *A. faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4, *Sphingobacterium* sp. Bi8, *Rhodococcus* sp. Bi10 и *S. multivorum* Bi2, при этом способность грамотрицательных штаммов синтезировать биоПАВы рамнолипидной природы подтверждается наличием в их геноме гена *RhlA*, а грамположительных штаммов – синтезировать биоПАВы липопептидной природы из-за наличия в их геноме гена *spf0*.

ДЕСТРУКЦИЯ ЛЕГКОЙ НЕФТИ КОММЕРЧЕСКИМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИМИ БИОПРЕПАРАТАМИ В ПРИСУТСТВИИ АБОРИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

Шаталина Е. С.*, Худокормов А. А., Карасева Э. В., Моисеева Е. В., Самков А. А.,
Волченко Н. Н., Гасюк О. А.

Кубанский государственный университет, Биологический факультет, Краснодар, *microgen-bio@yandex.ru*
**shatalina-liza@mail.ru*

На сегодняшний день одной из главной проблемой современного мира является загрязнение нефтепродуктами окружающей среды. Нефть – часто встречаемый загрязнитель техногенного характера. Одним из самых щадящих для экосистем способов ликвидации последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами является добавление микробных биопрепаратов, нацеленных на очистку пострадавшей от загрязнения окружающей среды. Однако на эффективность препаратов может оказывать существенное влияние тип почвы и качественный и количественный состав аборигенной микрофлоры. В связи с чем представляется актуальным изучение эффективности деструкции нефтепродуктов коммерческими нефтеокисляющими биопрепаратами в присутствии аборигенной микробиоты.

Целью работы являлось определить степень деструкции легкой пластовой нефти (с преимущественным содержанием фракций $C_6 - C_{19}$) в минеральной жидкой среде некоторыми распространенными коммерческими биопрепаратами («Бионэтик», «EcoSave», «Дестройл», «МД», «DOP-UNI», «Микрозим(tm) Петро Трит», «Bioxumin oil», «Multibac active»), в присутствии аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры почвы. В качестве источника аборигенной микрофлоры была выбрана почва вблизи трубопровода, по которому осуществляется транспортировка нефти к месту переработки.

В качестве минеральной среды использовали среду Диановой-Ворошиловой. В 50 мл стерильной среды вносили 0,1 г биопрепарата и 0,5 г стерильной пластовой нефти. Культивирование проводили в конических колбах объемом на орбитальном шейкере Biosan при 125 об/мин и температуре 25 °С течение 144 часов. По окончании культивирования флуориметрически определяли содержание нефтепродуктов.

На первом этапе определяли эффективность деструкции пластовой нефти в минеральной жидкой среде. В результате было установлено, что по отношению к исследуемой нефти, эффективность нефтеокисления 75–100 % проявили биопрепараты «EcoSave», «Бионэтик», «Дестройл», «Bioxumin oil», эффективность 50–75% препараты «Микрозим(tm) Петро Трит» и «МД», препарат «Multibac active» утилизировал менее 50 % исследуемой пластовой нефти. На втором этапе работ для исследования влияния аборигенной микрофлоры на процесс деструкции нефтепродуктов биопрепаратами в 50 мл стерильной среды Диановой-Ворошиловой вносили 0,1 г биопрепарата, 0,5 г стерильной пластовой нефти и 5 г почвы в качестве источника аборигенной микробиоты. В результате было обнаружено достоверно значимое снижение эффективности деструкции нефти в вариантах с препаратами «МД» и «Дестройл», что может служить подтверждением влияния аборигенной микрофлоры на эффективность окисления легкой пластовой нефти некоторыми биопрепаратами.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ Mg^{2+} И Zn^{2+} НА СИНТЕЗ И НАКОПЛЕНИЕ ПОРФИРИНОВ В ПОКОЯЩИХСЯ МИКОБАКТЕРИЯХ

Шашин Д. М.* , Никитушкин В. Д., Савицкий А. П., Глигонов И. А.,
Капрельянц А. С., Шлеева М. О.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва, info@fbras.ru
*dmshashin@gmail.com

Возбудитель туберкулёза *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) способен переходить в покоящееся состояние, приводя к развитию латентной формы заболевания. В таком виде микобактерии долгое время персистируют в организме человека и, под воздействием ряда факторов, способны перейти к активному размножению и вызвать развитие активной формы заболевания. Ранее, было обнаружено, что покоящиеся формы *Mycobacterium (Mycobacterium) smegmatis* накапливают промежуточные метаболиты синтеза гема – порфирины в значительном количестве. Эти молекулы являются фотосенсибилизаторами, способными приводить к фотоинактивации бактерий, что может служить основой для фотодинамической терапии туберкулёза. Целью данной работы являлось изучение способов стимуляции синтеза и накопления эндогенных порфиринов в микобактериях (*M. smegmatis* и *Mtb*).

Методы. Покоящиеся формы микобактерий были получены в среде Сотона в условиях постепенного снижения pH среды (Shleeva, 2011; Kudykina, 2011). Для стимуляции синтеза порфиринов в клетках *Mtb* в среды вносили 5-аминолевулиновую кислоту, а также разные концентрации ионов металлов Mg^{2+} и Zn^{2+} . Экстракция накопленных порфиринов была проведена последовательно с помощью систем растворителей хлороформ-метанол-вода и затем PBS-Triton. Определение концентрации пигментов в экстрактах и культуральной жидкости проводили спектрофотометрически.

Результаты. Было выявлено, что при увеличении концентрации магния в 5 и 10 раз (с 5 мМ до 25 и 50 мМ) и при увеличении концентрации цинка в 10 раз относительно стандартной среды Сотона, наблюдалось увеличение продукции (в 1,5 раза) эндогенных порфиринов

в *M. smegmatis*. Синергическое действие этих концентраций цинка и магния (10 мкМ и 25 мМ соответственно) приводит к 8-кратному увеличению продукции порфиринов в покоящихся формах *Mtb*, при этом монодействие 25 мМ магния увеличивает продукцию порфиринов в 3,5 раза, а увеличение концентрации цинка в 10 раз приводит к 2,5-кратному увеличению внутриклеточных порфиринов у *Mtb*.

Выводы. Комбинация металлов магния и цинка индуцируют повышенный синтез порфиринов в микобактериях.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 19-15-00324.

АНТИМИКРОБНЫЙ ЭФФЕКТ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МИКРО- И НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ

Шишкин А. Ю.*, Смирнов В. Ф., Смирнова О. Н., Фукина Д. Г.,
Корягин А. В., Сулейманов Е. В., Зеленова Е. О.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород

*uandshi@yandex.ru

Многие органические и неорганические химические соединения обладают фотокаталитической активностью. Особое внимание уделяется фотокаталитически активным оксидам тяжелых металлов, обладающих антимикробной активностью, и находящихся широкое применение в медицине, ветеринарии, бытовой химии. Показано, что при действии света на данные соединения их антимикробный эффект усиливается. Исследования показали, что наиболее эффективно фотокаталитическая активность проявляется для микро- и наноразмерных частиц оксидов металлов. Установлено, что их токсическое действие на микроорганизмы зависит не только от размеров частиц, но и от их концентрации, формы, от интенсивности, длительности и спектрального состава света, а также от вида биологических объектов. В связи с этим целью настоящей работы было исследование антимикробных свойств фотокаталитически активных микро- и наноразмерных частиц по отношению к бактериям *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

В исследовании использовались оксид вольфрама, средний размер частиц 674 нм и синтезированный в НИИ Химии ННГУ $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ в виде микро- и наноразмерных частиц диаметром 4658 нм и 736 нм соответственно.

В качестве тест-культур микроорганизмов использовали бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P.

В качестве источников света использовали прожекторы PFL-C3 светодиодные мощностью 30 Вт и 50 Вт. Интенсивность освещенности составили 757 мкМ фотонов/м²*с (для источника 30 Вт) и 1218 мкМ фотонов/м²*с (для источника 50 Вт).

Антимикробное действие препаратов оценивалась на основе выживаемости бактерий, которая определялась на основе изменения титра культур бактерий. В качестве контроля служили варианты титры бактерий в условиях темноты и света без присутствия химических соединений.

Установлено, что все исследуемые соединения вызывают снижение выживаемости бактерий, как в условиях света, так и в условиях темноты. Снижение выживаемости микроорганизмов происходило в большей степени в присутствии наноразмерных частиц $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. Действие света усиливала антимикробную активность, особенно для наноразмерного $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. С увеличением длительности экспозиции антимикробный эффект исследуемых соединений усиливался.

Показано, что антимикробная активность микро- и наноразмерных оксидов металлов WO_3 и $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ усиливается под воздействием света. Антимикробный эффект наиболее выражен у наноразмерного вещества $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$.

РАСПЫЛИТЕЛЬНОЕ ВЫСУШИВАНИЕ И ОЦЕНКА ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ ПСИХРОАКТИВНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Щербакова П. А.^{1,2,*}, Гавирова Л. А.^{1,2}, Шестакова О. О.^{1,2}, Исаченко А. И.³,
Шестаков А. И.^{1,2}

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²Фонд поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых
«Национальное интеллектуальное развитие»

³ООО «Арктический научный центр»

*polia.scherbackova@yandex.ru

Распылительное высушивание, основанное на испарении влаги при впрыскивании жидкости в камеру с разогретым воздухом, широко применяется для длительного сохранения культур микроорганизмов в жизнеспособном состоянии. Хранение полученного в процессе высушивания продукта не требует создания особых условий, что является значительным преимуществом при разработке препарата для утилизации нефтяных загрязнений на основе штаммов психроактивных углеводородоокисляющих микроорганизмов.

В ходе данной работы определяли выживаемость культур углеводородоокисляющих микроорганизмов в процессе распылительного высушивания, а также спустя 2 и 5 месяцев хранения полученного порошка при +4°C. Для этого штаммы *Psychrobacter cibarius* I-13, *Arthrobacter psychrochitiniphilus* III-41, *Rhodococcus qingshengii* III-44, *Rhodococcus qingshengii* III-45, *Rhodococcus qingshengii* III-47 культивировали на жидкой модифицированной среде modPCB, проводили концентрирование культуральной жидкости в 3 раза, и полученную суспензию подвергали распылительному высушиванию. Непосредственно после процесса распылительного высушивания, а также спустя 2 и 5 месяцев хранения продукта при +4°C проводили оценку выживаемости микроорганизмов путем посева образцов на плотную среду modPCA для подсчета количества жизнеспособных клеток в порошке.

В результате работы показано снижение количества жизнеспособных клеток микроорганизмов в процессе высушивания в среднем в 100 раз: $4,6 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г сухого вещества до высушивания и $5,7 \cdot 10^9$ КОЕ/г порошка после высушивания для штамма *Psychrobacter cibarius* I-13, $6,1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г сухого вещества и $3,6 \cdot 10^9$ КОЕ/г порошка – для *Arthrobacter psychrochitiniphilus* III-41, $1,6 \cdot 10^{12}$ КОЕ/г сухого вещества и $2,3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г порошка – для *Rhodococcus qingshengii* III-44, $2,2 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г сухого вещества и $2,4 \cdot 10^9$ КОЕ/г порошка – для *Rhodococcus qingshengii* III-45, $3,3 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г сухого вещества и $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г порошка – для *Rhodococcus qingshengii* III-47. После хранения в течение 2 месяцев количество жизнеспособных клеток снизилось не более, чем в 100 раз – максимальное количество определено для образца *Rhodococcus qingshengii* III-44 ($1,2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г), минимальное – для штамма *Rhodococcus qingshengii* III-45 ($1,2 \cdot 10^7$ КОЕ/г). Спустя 5 месяцев хранения максимальное количество жизнеспособных клеток показано для штамма *Psychrobacter cibarius* I-13 ($6,2 \cdot 10^8$ КОЕ/г), минимальное – для штамма *Rhodococcus qingshengii* III-47 ($1,7 \cdot 10^6$ КОЕ/г).

СТРУКТУРА НОВОЙ АТИПИЧНОЙ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ СУПЕСЕМЕЙСТВА H2TH ИЗ *Bacteroides thetaiotaomicron*

Юдкина А. В.^{1,*}, Гарсиа-Диас М.², Жарков Д. О.^{1,3}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,

²Университет Стони Брука, Стони Брук, США

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск,

*ayudkina@niboch.nsc.ru

Введение: ДНК-гликозилазы – ферменты, которые участвуют в сохранении целостности генома как ключевой элемент пути эксцизионной репарации оснований, узнавая и удаляя поврежденное основание из ДНК. Недавно, полногеномное секвенирование некоторых бак-

терий позволило обнаружить ряд новых ДНК-гликозилаз, принадлежащих большому суперсемейству «спираль – два поворота – спираль» (H2TH). Однако, обнаруженные ДНК-гликозилазы демонстрируют низкий процент гомологии с известными последовательностями H2TH ДНК-гликозилаз. Наиболее интересным организмом оказался *Bacteroides thetaiotaomicron*, у которого наряду с известными ДНК-гликозилазами H2TH присутствуют две атипичных. Цель данной работы – структурная и биохимическая характеристика новых ДНК-гликозилаз из *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Материалы и методы: В работе использовались классические методы молекулярного клонирования, оптимизированный протокол для выделения новых атипичных белков, классические биохимические подходы для характеристики белков, а так же метод белковой кристаллографии для расшифровки структуры ДНК-гликозилазы *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Результаты и обсуждения: Молекулы ДНК-гликозилаз суперсемейства H2TH обладают рядом особенностей, обеспечивающих их каталитическую активность. Так, большинство H2TH несут высоко консервативный мотив PELPEVET на N-конце и используют N-концевой остаток пролина как ключевой остаток необходимый для катализа. Однако, ДНК-гликозилазы H2TH *Bacteroides thetaiotaomicron* содержат атипичные аминокислотные остатки на N-конце, такие как изолейцин и лизин, и значительно отличающийся N-концевой мотив. Мы получили и расшифровали кристаллическую структуру H2TH ДНК-гликозилазы *Bacteroides thetaiotaomicron* разрешением 2.0 Å и обнаружили ряд структурных особенностей, характерных для ДНК-гликозилаз данного суперсемейства, при этом субстратная специфичность фермента, отличается от представителей H2TH.

Заключение: Таким образом, мы изучили структурные и биохимические аспекты новых атипичных представителей ДНК-гликозилаз суперсемейства H2TH, которые помогут установить положение новых белков среди уже изученных.

Работа поддержана в рамках гранта РФФ 21-64-00017

Юдкина А. В. благодарит программу Фулбрайта за возможность проводить эксперименты в США.

ФУЗАРИОЗНОЕ УСЫХАНИЕ — НОВОЕ ВРЕДНОСНОЕ ГРИБНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ ВИНОГРАДА В РЕГИОНЕ ЗАПАДНОГО ПРЕДКАВКАЗЬЯ (РОССИЯ)

Юрченко Е. Г., Савчук Н. В.*

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия,
Краснодар, kubansad@kubannet.ru
*yug.agroekos@yandex.ru

Филлоплана растений винограда, колонизируется большим количеством и разнообразными популяциями микромицетов, различной функциональной направленности, среди которых наибольшее значение имеют патогенные виды. Изменения условий возделывания винограда, происходящие в настоящее время в результате активной антропогенной деятельности и погодных стрессов, оказывают всё большее влияние на среду обитания грибных организмов. Процессы, сопровождающие антропогенную и абиотическую трансформацию микопатоккомплексов ампеелоценозов стимулируют адаптациогенез у грибов, способствуя появлению новых вредоносных микопатогенов.

Целью исследований было установить видовой состав микопатоккомплекса, вызывающего новое заболевание виноградной лозы – усыхание генеративных органов, выявить особенности его патогенеза на растениях винограда и вредоносность.

Выделение культур грибов осуществляли из пораженных органов винограда. Биообразцы предварительно дезинфицировали 70 % спиртом в течение 1 мин. и 1 % раствором гипохлорита натрия в течение 5 мин., затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Выделение микромицетов проводили на картофельном, картофельно-морковном агаре, также использовали метод влажной камеры. Идентификацию видов проводили, используя определители по морфологическим признакам и методом ПЦР. Характер патогенеза и вредоносность изучали с использованием общепринятых в фитопатологии и виноградарстве методов и методик.

Выявлено новое заболевание винограда в ампелоценозах Западного Предкавказья – фузариозное усыхание генеративных органов, доказано его инфекционное происхождение. На основании анализа видовой структуры микопатоксиса усыхания соцветий и гроздей, доли и частоты встречаемости видов, скрининга на патогенность и вирулентность изолятов культур в качестве основных возбудителей усыхания генеративных органов винограда впервые установлены грибы *Fusarium proliferatum* и *F. oxysporum*. Вид *F. proliferatum* Sheldon. был впервые определен как патогенный для виноградников России. Фузариозное инфицирование соцветий/гроздей винограда может быть, как первичным, так и вторичным. Первичное заражение происходит в основном во время цветения – грибы рода *Fusarium* Link. проникают в ткани генеративных органов через цветки или через поранения (раневой паразитизм). Наиболее часто в качестве вторичной инфекции фузариевые грибы выступают после поражения гроздей оомицетом *Plasmopara viticola* Sacc. (милдью). Установлено, что фузариозное усыхание генеративных органов винограда является вредоносным заболеванием. На поражаемых столовых сортах винограда в промышленных насаждениях средний вес грозди может снизиться в среднем на: 28,3 % (сорт Августин), 20,7 % (сорт Кишмиш лучистый), 17,6 % (сорт Молдова), 14,4 % (сорт Аркадия). В модельных опытах было установлено, что наибольший ущерб заболеванию может причинить при заражении винограда во время цветения, которое может привести к снижению веса грозди более чем на 50 % (сорт Августин). Высокая вредоносность фузариозного усыхания вызывает необходимость разработки специальных мер борьбы с данным заболеванием.

АНТИМИКРОБНЫЕ СПЕКТРЫ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНИКА БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Якушев А. В.¹, Карабанова А. А.², Никитина С. А.¹, Ефименко Т. А.², Демьянкова М. В.², Глухова А. А.², Грачёва Т. А.¹, Ефременкова О. В.²

¹Факультет почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

²ФГБНУ «НИИНА», Москва, a_yakushev84@mail.ru

Введение. Знание особенностей антимикробных спектров актиномицетов в кишечнике разных почвенных животных позволит целенаправленно искать продуцентов новых антибиотиков. **Цель** – сравнить антимикробные спектры актиномицетов, выделенных из кишечника животных, контрастных по местообитанию, систематической и трофической группе. **Материалы и методы.** Штаммы, выделялись из кишечника *Leptinotarsa decemlineata*, *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha sp.* и их кормов (листьев картофеля, гнилой древесины и листового опада соответственно). Активность культуральных жидкостей определяли методом лунок по отношению к 11 штаммам бактерий и грибов, в том числе антибиотикорезистентных. **Результаты и обсуждение.** По факторному анализу продуценты отличаются друг от друга по силе антагонизма (сумма диаметров зон подавления всех тест-культур), но по этому показателю не различаются штаммы, выделенные из разных субстратов. По непараметрическому дисперсионному анализу штаммы из листьев картофеля и древесины отличаются зоной подавления на *L. mesenteroides*, *S. cerevisiae*, *A. niger*. Дискриминантный анализ установил различия у штаммов, выделенных из древесины, опада, кишечника *Orthomorpha sp.*, листьев картофеля и личинок *L. decemlineata*. Штаммы из имаго *L. decemlineata* не отличаются от выделенных из листьев, а штаммы из кишечника *N. dawydoffiae* не отличаются от штаммов из гнилой древесины. Различия связаны с относительно более сильным антагонизмом к одним тест-штаммам, чем к другим и не сводятся к простым для понимания отличиям (грибы – бактерии, грам(+) – грам(-), резистентные – чувствительные штаммы). **Выводы.** Различия в спектрах кишечных актиномицетов у разных животных обусловлены не только их транзитом из корма, но и селективным воздействием кишечной среды, что указывает на экологическую значимость их антимикробной активности в кишечнике. *Работа выполнена в рамках темы государственного задания «Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал», № 121040800174-б.*

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ НОВОГО ШТАММА *L. FERMENTUM AG8*

М. Наит Яхиа, Ожегов Г. Д., Каюмов А. Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Введение: Появление устойчивых к антибиотикам патогенов во всем мире приводит к трудностям в лечении инфекционных заболеваний. Антимикробные пептиды (бактериоцины) обладают многообещающим потенциалом в борьбе с антибиотикорезистентными патогенами. Бактериоцины – это небольшие антимикробные пептиды, вырабатываемые многочисленными бактериями, например, молочнокислыми бактериями. Они действуют против патогенных бактерий с высокой эффективностью и специфичностью, разрушая клетки-мишени путем образования пор в мембране и/или ингибирования синтеза клеточной стенки.

Материалы и методы: Штамм *L. fermentum AG8* был выделен из фекалий здоровой женщины. Для выделения антибактериальных пептидов использовали твердофазную экстракцию. 24- или 48-часовую культуру штамма *L. fermentum AG8* инкубировали при 25 °С или 80 °С в течение 30 минут. Затем рН корректировали до 2,0, 4,0 или 8,0 и клетки удаляли центрифугированием. Бесклеточный супернатант загружали на колонку C18 SPE, уравновешенную ацетонитрилом, и промывали 1 объемом чистой воды. Пептидная фракция элюировалась 2 объемами 25 % ацетонитрила, высушивалась, растворялась в воде очищенной. Антибактериальную активность тестировали методом «пятно на агаре». Для этого на чашку Петри с газоном тест-штаммов (*P. aeruginosa* и *S. aureus*) вносили 10 мкл исследуемого образца. Через 24 часа измеряли зоны ингибирования.

Результаты: Наибольшую активность проявлял пул веществ, полученный из 48-часовой культуры при доведение рН до 2,0 перед центрифугированием. При этом нагревание в течение 30 минут практически не влияло на активность, что свидетельствует о термостабильности антибактериального соединения. Активность против обоих тест-штаммов была на одном уровне.

Выводы: Штамм *L. fermentum AG8* производит термостабильные антибактериальные соединения, активные в отношении бактерий. Поскольку низкое значение рН увеличивает выход антибактериального соединения, основное антибактериальное соединение мы предполагаем, что оно адсорбируется на клеточной стенке штамма-продуцента при щелочном рН и переходит в культуральную жидкость при кислом рН. Дальнейшие эксперименты, включая ВЭЖХ, помогут идентифицировать антибактериальное соединение.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (MD-572.2020.4).

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *BACILLUS VELEZENSIS X-BIO-1*

Дилбарян Д. С., Каташинский А. И., Васильченко А. С.

Лаборатория антимикробной резистентности, Институт экологической
и сельскохозяйственной биологии (X-BIO),
Тюменский государственный университе

Актуальность *Bacillus velezensis* является аэробной, грамположительной, свободноживущей, формирующей эндоспору почвенной бактерией. Данный микроорганизм рассматривается как перспективный объект для разработки биопестицидов, способных ингибировать рост и развитие широкого спектра патогенов растений, к числу которых относятся бактерии, грибы и нематоды. Известно, что *Bacillus velezensis* продуцирует антимикробные соединения разной химической природы. Установление структур и исследование свойств активных метаболитов *Bacillus velezensis* является актуальной задачей, которая способствует целенаправленному отбору штаммов для создания микробиологических препаратов.

Цель исследования заключается в поиске эффективных методов выделения антимикробных метаболитов, продуцируемых *Bacillus velezensis*, установлении их химических структур и свойств.

Материалы и методы В работе был использован штамм *Bacillus velezensis* X-BIO-1. Определение оптимального температурного режима с целью получения биологически активных метаболитов осуществляли путем культивирования исследуемого микроорганизма при разных температурах. Выделение антимикробных веществ проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для установления химической структуры активных фракций был выполнен масс-спектрометрический анализ. Антибиотическую активность образцов определяли в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Качественную оценку химического состава биологически активных метаболитов проводили путём инкубирования образцов с протеазами.

Результаты В результате культивирования *Bacillus velezensis* X-BIO-1 при 15, 28, 37 и 45 °С было установлено, что оптимальная температура для культивирования данного микроорганизма составляет 28 °С. Определена минимальная ингибирующая концентрация в отношении штамма *Staphylococcus aureus* 209P. Масс-спектрометрический анализ показал наличие нескольких молекулярных ионов с m/z 367.2281 (брутто-формула C₂₄H₃₀O₃) и 471.2396 (брутто-формула C₂₈H₃₀N₄O₃).

Выводы Таким образом, проведенные исследования показали, что *Bacillus velezensis* является источником биологически активных метаболитов, свойства которых позволяют использовать данные соединения в качестве антимикробных веществ.

ЭКСТРАКТ КОРЫ ДУБА КАК СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

Яшников А. В., Васильченко А. С.

Лаборатория антимикробной резистентности,
Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-bio),
Тюменский государственный университет

Актуальность Болезни растений микробной этиологии являются повсеместной серьезной угрозой биобезопасности человечества. Существующие подходы в борьбе с микробными патогенами базируются на поиске и синтезе новых антимикробных соединений, действующих бактерицидно или бактериостатически. Другой, и относительно новый подход, направлен на снижение вирулентности, но не жизнеспособности микроорганизмов, что способствует профилактике возникновения антибиотикорезистентности. В этом случае, основной мишенью подобных препаратов являются процессы межклеточной коммуникации микроорганизмов – Quorum Sensing (QS). Данная работа посвящена исследованию потенциала малых молекул, экстрагируемых из коры дуба, как QS-ингибиторов вирулентности фитопатогенных микроорганизмов.

Цель – оценить особенности воздействия экстракта коры дуба на вирулентность бактериального фитопатогена *Pectobacterium carotovorum* VKM-B-1247.

Материалы и методы В работе, в качестве модельного микроорганизма, использовали штамм *P. carotovorum* VKM-B-1247 и экстракт, полученный органическими растворителями из фармакологического препарата коры дуба (Фармацвет, Россия). Идентификацию фитохимических веществ проводили методом газовой хроматографии. Для определения анти-QS активности экстракта использовали различные биосенсоры *S. violaceum* CV 026 и биолюминесцентный сенсор *E. coli* MG 1655 pVFR1-lux. Действие экстракта коры дуба на продукцию ферментов, разрушающих клеточную стенку, определяли по целлюлозной и протеазой активности. Защитное действие экстракта *in vivo* оценивали по развитию симптомов мягкой гнили на клубнях картофеля, предварительно обработанных действующим препаратом.

Результаты Исследуемый экстракт в концентрациях от 0,25–1,0 мг/мл не оказывает бактерицидного действия на *P. carotovorum*, однако дозозависимо подавляет продукцию бактериальных аутоиндукторов Сб-оксо-ГСЛ. При культивировании пектобактерий на среде, содержащей экстракт коры дуба, наблюдается дозозависимое снижение активности проте-

аз и целлюлаз. При заражении *P. carotovorum* клубней картофеля, обработанных экстрактом, некроз тканей происходит медленнее и менее выражено в пересчете на процентное соотношение пораженной ткани к интактной. Методом ГХ-МС в экстракте обнаруживались такие биологически активные молекулы как: 2,6-дитретбутил-4-метилфенол, ионол, растительный фитостероид гамма-систостерол, лупеол и терпеноид Friedelan-3-one.

Выводы Кора дуба традиционно используется в лечении и профилактике инфекций бактериальной природы у народностей в странах Европы. В рамках данной работы впервые продемонстрирован потенциал синтезируемых дубом (*Quercus* sp.) молекул в борьбе против фитопатогенов. Способность этих молекул интерферировать с процессами межклеточной коммуникации *P. carotovorum*, ведет в конечном итоге к модуляции QS-зависимой вирулентности через снижение активности ряда ферментов. Практическая значимость этого феномена в защите растений была продемонстрирована в условиях модельной инфекции картофеля, в котором препарат на основе экстракта коры дуба показал защитное действие.

ТАТ-НИТИ — НОВЫЙ ТИП ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ

Галева А. В., Сюткин А. С., Павлова Е. Ю., Пятибратов М. Г.

Институт белка Российской академии наук, Пущино

Введение В данной работе описывается новый тип поверхностных структур — Tat-нити, обнаруженные у галофильной археи *Haloarcula hispanica*. Уникальной особенностью является наличие твин-аргининового мотива в составе основного структурного белка НАН_0240, из которого строятся исследуемые филаменты. Данный мотив встречается у некоторых белков бактерий, архей и растений, секретирующихся по Tat-пути. Но, до сегодняшнего момента, не было описано ни единого случая использования этого пути для секреции полимерных нитевидных структур. Таким образом, обнаруженные нами Tat-нити являются уникальными в своем роде структурами.

Материалы и методы В работе использовался ауксотрофный штамм *Har. hispanica* DF60 (с делецией гена *pyrF*, участвующего в синтезе пиримидинов), специально сконструированный для генно-инженерных манипуляций (Liu et al., 2011). Были получены мутантные штаммы с делециями генов: *hah_0240*, *hah_0243*, *hah_2955*. Для изучения структуры и свойств Tat-нитей использовали спектроскопию кругового дихроизма, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, электронную микроскопию.

Результаты и обсуждение В ходе исследований было показано, что штамм DF60 наряду с жгутиками (диаметр 10–11 нм) продуцирует тонкие филаменты диаметром около 3 нм. Мы выяснили, что основным структурным компонентом, из которого строятся данные нити, является белок НАН_0240. Данный белок не имеет гомологии с белками архелл (жгутиков), пилей и других известных надмолекулярных структур архей. Он не содержит сигнального пептида, необходимого для секреции по Sec-пути, который используется для археллинов и пилинов. Используя алгоритм Tat-find (Rose et al., 2002), мы нашли в составе белка НАН_0240 мотив (NRRSVL), характерный для т. н. «твин-аргининового» пути транслокации (tat-путь). Поэтому, мы решили обозначить обнаруженные нами структуры, как Tat-нити. Анализируя геномное окружение близких гомологов гена *hah_0240*, мы обнаружили консервативный кластер ассоциированных с ним генов, соответствующих *hah_0237* – *hah_0243*, которые присутствуют в геномах представителей рода *Haloarcula* и у трёх видов рода *Haloferax*. Функции большинства из них не установлены. Известно, что белок НАН_0243 относят к классу сигнальных пептидаз. Мы предполагаем, что данная пептидаза может участвовать в процессинге белка НАН_0240. С большой долей вероятности все белки данного кластера могут выполнять общие задачи, связанные с синтезом Tat-нитей. Для подтверждения участия белка НАН_0240 в формировании Tat-нитей, мы получили мутантные штаммы с делециями генов *hah_0240* и *hah_0243*. Также мы удалили ген общей сигнальной пептидазы для археллинов и пилинов *hah_2955*. Удаление данного гена должно привести к прекращению синтеза жгутиков и пилей, присутствие которых может затруднить интерпретацию экспериментальных данных для Tat-нитей. Как показала электронная микроскопия, клетки штаммов Δhah_0240 и Δhah_0243 продуцировали жгутики, но утрачивали способность синтезировать тонкие ни-

тевидные структуры (Tat-нити). Тогда как в штамме *Δhah_2955*, наоборот, синтез жгутиков и пилей был подавлен, на клетках обнаруживались только Tat-нити. В дальнейшем мы планируем более детально изучить роль каждого из генов кластера *hah_0237 – hah_0243*, а также установить биологическую функцию Tat-нитей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-04-01327.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

Маградзе Е. И.

Удмуртский государственный университет, Ижевск

Плодородие почвы является актуальной проблемой: население Земли стремительно увеличивается, почвенные ресурсы истощаются. Для получения больших урожаев необходимо постоянное применение удобрений. В последние годы особенно актуальными стали разработка и применение бактериальных удобрений как экологически безопасных. Важным качеством биоудобрений должна быть их небольшая цена. Поэтому необходимо использовать дешевые питательные среды. Молочная сыворотка является не только дешевым сырьем для получения бактериальных удобрений, но и источником загрязнения окружающей среды. Поэтому использование молочной сыворотки в качестве питательной среды для бактерий может утилизировать этот отход производства молочной промышленности.

Цель работы: разработка бактериальных удобрений на основе молочной сыворотки.

В качестве питательной среды использовали стерильную разведенную молочную сыворотку. Культивировали бактерии рода *Azotobacter* и *Streptomyces*, получая монобактериальные удобрения. Изучали кинетические параметры роста бактерий, а также изменение КОЕ азотобактеров после хранения удобрений.

Результаты исследования показали, что оптимальным является добавление 10 % посевного материала от конечного объема культуральной жидкости. При добавлении 1 % и 0,1 % посевного материала накапливается меньше конечной биомассы. Добавление посевного материала в объеме большем, чем 10 % от конечного объема культуральной жидкости экономически нецелесообразно. При хранении бактериальных удобрений, содержащих азотобактеры, в течение двух месяцев количество бактерий уменьшилось, однако их концентрация осталась на уровне 10^6 кл/мл, что является хорошим показателем для биоудобрений.

Таким образом, определение кинетических параметров роста исследуемых бактерий на молочной сыворотке является первым шагом на пути к технологии производства бактериальных удобрений на основе молочной сыворотки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК МОДУЛЯТОРОВ РОСТА И МЕТАБОЛИЗМА *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D

Маркова Ю. А.*, Беловежец Л. А., Левчук А. А., Оборина Е. Н., Адамович С. Н.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск,
Иркутский институт химии им. Фаворского СО РАН, Иркутск
*juliam06@mail.ru;

Rhodococcus qingshengii VKM AC-2784D был выделен из нефтезагрязненных почв в районе пос. Тыреть, Иркутской области и проявил себя как эффективный нефтеструктор и фитозащитный агент. Для оптимизации сред с целью ускорения накопления биомассы родококка был изучен ряд атрановых соединений, синтезированные в ИрИХ СО РАН. Ранее показано, что протатраны являются биологически активными соединениями, обладающими стимулирующим действием на рост *S. cerevisiae*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* и др.

Материалы и методы. Из группы протатранов были выбраны 4 соединения. В качестве положительного контроля использовали триэтаноламин, как их предшественник. Эксперименты проводили на следующих питательных средах: МПБ (Оболонск) и минеральных питательных средах 8E с разными источниками углерода (глюкоза, нафталин) в концентрации 5 г/л или без углерода. Оценивали скорость роста и биопленкообразование в динамике через 1, 4, 5 и 7 суток культивирования, активность дегидрогеназных ферментов, деструкцию нафталина, синтез сурфактантов и др.

Результаты. Установлено, что природа источника углерода оказывает существенное воздействие на силу и характер влияния исследуемых протатранов на рост и биопленкообразование родококков. Отмечено незначительное сокращение лаг фазы в МПБ, стимуляция роста в начале культивирования и ее падение в среде без углерода или возвращение к контрольным значениям в среде 8E с глюкозой или сложное, но преимущественно неблагоприятное воздействие при культивировании в среде 8E с нафталином. Воздействие на биопленкообразование было преимущественно негативным, особенно в присутствии нафталина. Все протатраны существенно снижали гидрофобность клеточной стенки и количество внеклеточных биосурфактантов, а также мобилизацию нитратного азота из среды культивирования.

Выводы. Таким образом, исследуемые протатраны стимулировали рост родококка, однако этот эффект был кратковременным и исчезал в процессе культивирования. Неблагоприятное воздействие на рост в присутствии нафталина, а также на синтез биосурфактантов не позволяет рекомендовать эти соединения для использования в составе биопрепаратов для биоремедиации. В то же время биологические эффекты которые оказывает данная группа соединений интересны и нуждаются в дальнейшем исследовании.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-016-00114 А.

ПОСТГЕНОМНАЯ БИОЛОГИЯ: НОВЫЕ ЗАДАЧИ / НОВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ

Кешелава В. Б.

Институт Биологического Приборостроения РАН, Пущино
ООО Простагност, Москва, Сколково

Почти 50-летний период доминирования инструментального эмпиризма в молекулярной биологии закончился его полной победой: просеквенирован геном почти всех биологических объектов ближнего круга, которых можно было поймать, собрать, вырастить или выделить. Молекулярная генетика в том виде, в котором мы ее знали, выполнила свое предназначение и закончилась. Началась пост-геномная эра, для которой характерно наличие низкоуровневой информации (первичной последовательности ДНК) и весьма ограниченное представление о том, какой биологический смысл она несет.

Однако не стало неожиданностью, что «полный перечень генетических и структурных компонентов организма недостаточен для описания или объяснения, а тем более для предсказания поведения многих сложных и разнообразных функций этого организма» при отсутствии понимания того «как кажущиеся несвязанными молекулярные события могут влиять на развитие сложного фенотипа» (1).

Для микробиологии это значит, что эпицентр активности от преимущественного сбора молекулярных данных перемещается на их систематический анализ с целью построения обобщающих метаболических моделей и, в конечном итоге, изучение физиологии микроорганизмов. При этом ключевым инструментом становится такой ферментер следующего поколения, способный охарактеризовать выбранное физиологическое состояние, неограниченно долго поддерживать выбранное состояние и при необходимости повторно находить это состояние.

Именно таким инструментом проектировался настольный ферментер «МИКРОБ», представляющий собой новую ступень в развитии биореакторов лабораторного класса, предназначенных для научных, технологических и образовательных целей.

Разработка делается под руководством биологов и для биологов. «МИКРОБ» проектируется как полнофункциональный ферментер, превосходящий конкурентные аппараты как по своим техническим характеристикам, так и по удобству пользователя.

Ведение экспериментальных работ в биореакторе «МИКРОБ» будет не только более комфортным, но и существенно менее затратным. Особенно заметными будут эти различия при длительных процессах культивирования и в ходе подготовки к ним: отработка технологических регламентов на дорогих субстратах, подбор конкретных значений параметров под очередную партию субстратов неопределенного сложного состава (меласса, патока и пр.), проверка стабильности рекомбинантов, микроразволюционные процессы под влиянием различных факторов, включая мутагены и ингибиторы, популяционная динамика в смешанных культурах и пр.

Рассматриваются технические особенности и обсуждаются функциональные возможности реактора «МИКРОБ».

1. National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences. *New Approaches to the Study of Complex Biological Processes*. NIH NIGMS Workshop Report. 1998.

METHYLOLIGELLA MARIS SP. NOV., НОВЫЕ МЕТИЛОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ МОРСКОЙ СРЕДЫ

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

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

К настоящему времени известны всего два вида рода *Methyloligella*: *M. halotolerans* C2^T (VKM B-2706^T) и *M. solikamskensis* SK12^T (VKM B-2707^T), выделенные из техногенных и природных соленых биотопов Урала (Doronina et al., 2013). Штаммы являются умеренно галофильными аэробными метилотрофами и продуцентами высокомолекулярного полигидроксибутирата и бипротектора эктоина. Поиск и изучение новых представителей рода *Methyloligella* актуальны для расширения знаний о биоразнообразии, распространении этих бактерий в природе, а также их биотехнологическом потенциале.

В этой работе мы охарактеризовали новые облигатно-метилотрофные бактерии, штаммы GL2^T и 2.7D, методами полифазной таксономии и предложили новый вид *Methyloligella maris* sp. nov.

Изучение морфологических, физиологических, хемотаксономических свойств и филогеномный анализ проводили, как описано ранее (Agafonova et al., 2020).

Новые аэробные метилотрофные бактерии (штаммы GL2^T и 2.7D) выделены из морской воды и ила (о.Лусон, Филиппины). Клетки представлены граммотрицательными, неподвижными, неспорообразующими, кеглевидными палочками (0,3–0,5×1,5–2,5 мкм), размножаются бинарным делением. Растут при 10–37°C (оптимум 28°C), pH 6,0–9,0 (оптимум pH 7,5–8,5), NaCl 0,5–9 % (оптимум 2–6%) в присутствии 0,5% метанола. В качестве источников углерода и энергии используют только метанол и метиламин, реализуют сериновый путь C₁-метаболизма. Доминирующие жирные кислоты C_{19:1}ω5, C_{18:0} и C_{18:1}ω7с, убихинон Q10. Доминирующие фосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, фосфатидилдиметилэтанолламин, фосфатидилэтанолламин, дифосфатидилглицерин. Сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК между штаммами GL2^T и 2.7D составило 99,9 %. Размер генома штамма GL2^T – 3,23 Mb (содержание G+C – 63,7 мол %). Исследуемые штаммы имели высокий уровень сходства по гену 16S рНК с представителями рода *Methyloligella*: *M. halotolerans* C2^T и *M. solikamskensis* SK12^T (98,1 – 98,5 %). Значения ANI и dDDH между штаммом GL2^T и *M. halotolerans* C2^T составили 78,9 % и 20,0 % соответственно, что ниже принятого значения для разделения видов (ANI < 95 %, dDDH < 70 %).

На основании филогеномного анализа, фенотипических и хемотаксономических признаков новые изоляты отнесены к новому виду *Methyloligella maris* sp. nov., типовой штамм GL2^T (= CCUG 75077^T = VKM B-3381^T).

Научное издание

3-й РОССИЙСКИЙ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНГРЕСС

г. Псков, 26 сен. – 1 окт. 2021 г.

Материалы конгресса

Электронное сетевое издание

Технический редактор: Н. А. Васильева
Компьютерная верстка: Н. А. Васильева

Подписано в печать 23.09.2021. Формат 60×90/8. Гарнитура FreeSetC.
Тираж 300 экз. Заказ № 5983. Усл. п. л. 37,0.