

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РАН**

**ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ**

**ИМ. С. Н. ВИНОГРАДСКОГО**

**ИНСТИТУТ БИОИНЖЕНЕРИИ**

**ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А. Н. БАХА**

**РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**МОО «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»**

**ТЕЗИСЫ**

**XI МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ–КОНФЕРЕНЦИИ**

**С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**«АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

**МОСКВА**

**1 — 2 НОЯБРЯ 2016 г.**



**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК**

## **Организационный комитет конференции**

### *Научный оргкомитет:*

**Скрябин Константин Георгиевич, академик РАН – сопредседатель**

**Попов Владимир Олегович, член-корр. РАН – сопредседатель**

**Гальченко Валерий Федорович, член-корр. РАН – сопредседатель**

**Пименов Николай Викторович, д. б. н. – сопредседатель**

### *Оргкомитет:*

**Бонч-Осмоловская, Е.А., д. б. н., проф.**

**Равин Н.С., д. б. н., проф.**

**Дедыш С.Н., д.б.н.**

**Мысякина И.С., д.б.н.**

**Хижняк Т.В., д.б.н.**

**Камионская Н.М., к.б.н.**

**Фролова А.А., секретарь**

*Адрес оргкомитета:* 117312, Москва, Проспект 60-летия Октября, д.7, корп.2.  
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.  
Тел.: (499) 135-21-39, Факс: (499) 135-65-30, e-mail: aa.frolova@yahoo.com

## **СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ:**



ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
АГЕНТСТВО  
НАУЧНЫХ  
ОРГАНИЗАЦИЙ



**1 ноября (вторник)**

**Место проведения: пр. 60-летия Октября, д.7, корп. 2**

**10.00**

## **ОТКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ**

10.00–10.15 Вступительное слово Председателя и сопредседателей оргкомитета

## **ПЛЕНАРНАЯ СЕКЦИЯ**

10.15–10.45 Новые термофильные прокариоты, участвующие в циклах серы и азота

**Г.Б. Слободкина**

*ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва*

10.45–11.15 Микробные сообщества вечной мерзлоты

**Е.М. Ривкина**

*ИФХБПП РАН, Пущино*

**11.15-11.45 Кофе-брейк**

**1 ноября (вторник)**

**СЕКЦИЯ I**

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ, ГЕНОМИКА  
И МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Председатель — к. б. н. Кубланов И. В.**

11.45–12.00 Почвенные азотфиксирующие цианобактерии рода *Nostoc*: морфология, филогения и биотехнологический потенциал

**Темралеева А.Д.<sup>1</sup>, Дидович С.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,  
Пушино, Россия*

<sup>2</sup>*Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь,  
Россия*

12.00–12.15 Ответ мицелиального гриба *Aspergillus niger* на комбинированное действие теплового и осмотических шоков

**Е. А. Януцевич<sup>1</sup>, Н. А. Синицына<sup>2</sup>, В. М. Терёшина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,  
Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский технологический университет», Москва, Россия*

12.15–12.30 Устойчивость сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio* к активным формам кислорода и тяжелым металлам

**Е. Г. Воробьева<sup>1</sup>, А. Л. Брюханов<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, институт микробиологии имени С.Н. Виноградского,  
Москва, Россия*

- 12.30–12.45 От литотрофии до гидролиза целлюлозы: метаболическое разнообразие гипертермофильных архей рода *Thermofilum*
- Т.В. Кочеткова**, О.А. Подосокорская<sup>1</sup>, А.В. Лебединский<sup>1</sup>, С.В. Тощakov<sup>2</sup>, И.В. Кубланов<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
- <sup>2</sup>Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта
- 12.45–13.00 Морфологическая изменчивость зеленых водорослей родов *Tetracystis* и *Spongiosocystis* в зависимости от условий культивирования
- С. В. Москаленко**, А. Д. Темралеева
- Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пуццино, Россия
- 13.00-14.00 Обед**
- 14.00–14.15 Разнообразие ключевых ферментов периферийного метаболизма, индуцирующихся у актинобактерий *Rhodococcus opacus* 1CP и *Rhodococcus wratislaviensis* G10 при росте на бензоате натрия
- О. В. Борзова**<sup>1,2</sup>, И. П. Соляникова<sup>2</sup>, Е. С. Шумкова<sup>2,3</sup>, Е. В. Емельянова<sup>2</sup>, Н. В. Присяжная<sup>2</sup>, Д. О. Егорова<sup>4</sup>, Е. С. Корсакова<sup>4</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>4</sup>, Л. А. Головлева<sup>2</sup>
- <sup>1</sup> Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуццино
- <sup>2</sup> ФАНО ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццино
- <sup>3</sup> ФАНО ФГБУН Институт биохимии, Москва
- <sup>4</sup> ФАНО ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь
- 14.15–14.30 Морфо-физиологические особенности новой психроактивной метилотрофной бактерии
- В. А. Зайчиков**<sup>1</sup>, Ю. Ю. Берестовская<sup>2</sup>, Л. В. Васильева<sup>2</sup>, А. М. Семенов<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
- <sup>2</sup>Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

- 14.30–14.45 Новые мезофильные аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии  
**В.А. Гайсин**, И.А. Брянцева, А.М. Калашников, Д.С. Груздев, Е.И. Бурганская,  
М.В. Сухачева, Волынчикова Е.А., Б.Б. Кузнецов и В.М. Горленко  
*ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
- 14.45–15.00 Характеристика бактериофагов из штаммов *Acinetobacter lwoffii*  
**Ермакова А.Я.**<sup>1</sup>, Белецкий А.В.<sup>1</sup>, Ракитин А.Л.<sup>1</sup>, Петрова М.А.<sup>2</sup>, Марданов А.В.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Институт биоинженерии РАН, Москва, Россия*  
<sup>2</sup>*Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*
- 15.00–15.30 Кофе-брейк**
- 15.30–15.45 Таксономические проблемы рода *Nostoc sp.* (*Cyanobacteria*)  
**Р.Р. Шалыгина**, С.С. Шалыгин<sup>2,3</sup>, В.В. Редькина<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН, г. Апатиты*  
<sup>2</sup>*Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина, г. Апатиты*  
<sup>3</sup>*John Carroll University, USA* 15.45-16.00
- 15.45–16.00 Анализ поведения почвенных штаммов *Arthrobacter agilis* Lush13 и *Microbacterium species* b51 в модельных стрессовых условиях  
**Н. С. Егозарьян**<sup>1,3</sup>, И. П. Соляникова<sup>1</sup>, Н. Е. Сузина<sup>1</sup>, В. Н. Поливцева<sup>1</sup>,  
Л. А. Головлёва<sup>1</sup>, А. Л. Мулюкин<sup>2</sup>, Г. И. Эль-Регистан<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пуццино, Россия*  
<sup>2</sup>*ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия*  
<sup>3</sup>*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
- 16.00–16.15 Распространение, характеристика и роль глюкокиназ у метанотрофных бактерий  
**Н. П. Солнцева**<sup>1,2</sup>, О. Н. Розова<sup>1</sup>, И. И. Мустахимов<sup>1,2</sup>, А. С. Решетников<sup>1</sup>, В. Н. Хмеленина<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пуццино, Россия*  
<sup>2</sup>*Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуццино, Россия*
- 16.15 – 18.15 Постерная сессия**

**2 ноября (среда)**

## **ПЛЕНАРНАЯ СЕКЦИЯ**

10.00–10.30 Микроорганизмы «дикие» и модифицированные в промышленной биотехнологии

**А.С. Яненко**

*ФГУП ГосНИИгенетика, г. Москва*

10.30–11.00 Промышленная технология удаления азота из сточных вод с использованием процесса анаммокс

**Н.В. Пименов**

*ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва*

**11.00-11.30 Кофе-брейк**

## **СЕКЦИЯ II**

### **МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ**

### **И ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Председатель — д. б. н. Марданов А. В.**

11.30–11.45 Филогенетическое разнообразие архей в микробных сообществах горячих источников Камчатки

**А.Ю. Меркель<sup>1</sup>**, И.Ю. Тарновецкий<sup>1,2</sup>, А.А. Первалова<sup>1</sup>, Е.А. Бонч-Осмоловская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН*

<sup>2</sup>*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова*

11.45–12.00 Бактериальные сообщества архипелага Новая Земля: микробиологическая характеристика и анализ устойчивости к физико-химическим факторам среды

**А. А. Белов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

- 12.00–12.15 Продукционные и деструкционные процессы в микробных сообществах солонowodных рек Приэльтонья  
**Канапацкий Т.А.**, Самылина О.С.  
*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
- 12.15–12.30 Биологический синтез наночастиц почвенными микроорганизмами  
**М. А. Купряшина**, Е. П. Ветчинкина, Е. А. Лощинина, А. М. Буров. В. Е. Никитина  
*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия*
- 12.30–12.45 Разнообразие микобиоты аридных почв как объект исследования жизнеспособности естественных эукариотных сообществ в моделируемых условиях Марса  
**Крючкова М.О.**<sup>1</sup>, Иванова А.Е.<sup>1</sup>, Воробьева Е.А.<sup>1,4</sup>, Чепцов В.С.<sup>1</sup>, Павлов А.К.<sup>2</sup>, Ломасов В.Н.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> *факультет почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*  
<sup>2</sup> *ФТИ РАН им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия;*  
<sup>3</sup> *СПбГПУ Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;*  
<sup>4</sup> *ИКИ РАН, г. Москва, Россия*
- 12.45–13.00 Молекулярный анализ разнообразия планктомицетов тундровых экосистем субарктической зоны России  
**А.А. Иванова**<sup>1</sup>, И.С. Куличевская<sup>1</sup>, С.Н. Дедыш<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*
- 13.00–14.00 Обед**
- 14.00–14.15 Экофизиологическая классификация микробных комплексов желудочно-кишечного тракта почвенной сапрофагической мезофауны  
**А.В. Якушев**  
*Факультет почвоведения МГУ, Москва, Россия*



- 14.15–14.30 Микробное разнообразие минералов карбонатно-силикатных пород  
**Сорокина А.В.**<sup>1</sup>, Щербакова Т.А.<sup>2</sup>, Синягина М.И.<sup>3</sup>, Маркелова М.И.<sup>3</sup>,  
Шарипова М.Р.<sup>1</sup>, Хиляс И.В.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт  
фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия  
<sup>2</sup>ФГУП «Центральный научно-исследовательский институт геологии нерудных  
полезных ископаемых», Казань, Россия  
<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Междисциплинарный  
центр протомных исследований, Казань, Россия
- 14.30–14.45 Применение метагеномного подхода и глубокого секвенирования ДНК для анализа  
микробиома чернозема типичного в России  
**М.А. Горбачева**  
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

### СЕКЦИЯ III

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Председатель — к.б.н. А.Г. Булаев

- 14.45–15.00 Антимикробная и антирадикальная активность актинобактерий, выделенных из  
пыльцы сосны *Pinus sylvestris*  
**Д.В. Аксенов-Грибанов**<sup>1,2</sup>, И.В. Войцеховская<sup>1</sup>, Е.С. Протасов<sup>1</sup>, М.В. Димова<sup>1</sup>,  
Ю.А. Лубяга<sup>1,2</sup>, Д.В. Лозовой<sup>1</sup>, Г.А. Скобин<sup>1</sup>, М.А. Тимофеев<sup>1</sup>  
*1 НИИ биологии ФГБОУ ВО «ИГУ»*  
*2 АНО Байкальский исследовательский центр*
- 15.00–15.15 Новый антибиопленочный агент – никлозамид  
**Н. А. Тетенева**, М. В. Журина, А. В. Ганнесен, С. В. Мартыанов, В. К. Плакунов  
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, Россия

15.15-15.45 **Кофе-брейк**

- 15.45–16.00 Ацидотолерантный гриб рода *Penicillium*, устойчивый к высоким концентрациям тяжелых металлов
- Глухова Л.Б.**<sup>1</sup>, Груздев Е.В.<sup>2</sup>, Белецкий А.В.<sup>2</sup>, Стрелкова Е.В.<sup>1</sup>, Карначук О.В.<sup>1</sup>, Равин Н.В.<sup>2</sup>, Марданов А.В.<sup>2</sup>
- <sup>1</sup> *Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск.*
- <sup>2</sup> *Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*
- 16.00–16.15 Разработка высокоактивного штамма *Streptomyces hygrosopicus* – продуцента фармацевтической субстанции рапамицина
- В.В. Савельева**<sup>1</sup>, Т.М. Воинова<sup>2</sup>, Е.В. Глаголева<sup>1</sup>, В.В. Джавахия<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>*Институт «Биоинженерии» РАН, Москва, Россия*
- <sup>2</sup>*ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Россия*
- 16.15–16.30 Устойчивость к ионам тяжелых металлов штаммов архей рода *Acidiplasma*
- Т. В. Ерофеева**<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>*Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН*
- 16.30–16.45 Микробиологическая индикация антибактериальной эффективности модифицированных лекарственных средств
- Д. И. Хватов**<sup>1</sup>, О. И. Верная<sup>2</sup>, В.П. Шабатин<sup>2</sup>, А.М. Семенов<sup>1</sup>, Т.И. Шабатина<sup>2</sup>, А.Н. Бородина<sup>2</sup>, М.А. Марков<sup>2</sup>
- Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет - 1, Химический факультет – 2, Москва, Россия*
- 16.45–17.00 Митохондриально-направленные антиоксиданты предотвращают и обращают фрагментацию митохондрий дрожжей *Dipodascus magnusii*
- А.П. Овченкова**<sup>1</sup>, Т.Н. Голева<sup>1</sup>, А.Г. Рогов<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия*

17.00–17.15    Конструирование улучшенных целлюлолитических ферментных препаратов с применением полисахаридмонооксигеназ

**Булахов А.Г.**, Волков П.В., Гусаков А.В., Рожкова А.М.

*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»*

17.15–17.30    Биоинформационный поиск новых лакказ у актинобактерий

**А. И. Конев**<sup>1</sup>, М. С. Куюкина<sup>1,2</sup>, И. Б. Ившина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия.*

<sup>2</sup>*ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия.*

**17.30 – 19.30    Фуршет. Подведение итогов конференции.**

## СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ

1. **Д. А. Бокарева<sup>1,3</sup>, А. И. Усов<sup>2</sup>, Е. П. Феофилова<sup>1</sup>, И. С. Мысякина<sup>1</sup>** Изменение содержания трегалозы в экзогенно покоящихся и прорастающих спорах зигомицетовых и аскомицетовых грибов. <sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия; <sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия; <sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия
2. **Бочкова Е. А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н.** Новый штамм анаммокс-бактерии *candidatus 'jettenia asiatica'*, отселекционированный в ходе длительного культивирования в проточных условиях, и активный в широком диапазоне концентрации субстратов и рН. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
3. **Бурганская Е.И., Гайсин В.А., Брянцева И.А.** Новая аноксигенная нитчатая фототрофная бактерия из высокоминерализованного озера киран. Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва
4. **Д.С. Груздев\*, В.А. Гайсин** Анализ филогении фототрофных *chloroflexi* с применением характерного профиля делеций и инсерций в белковых последовательностях. ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
5. **Д.Ж. Давыдов<sup>1</sup>, Н.В. Ануфриева<sup>2</sup>, Е.А. Морозова<sup>2</sup>, В.С. Покровский<sup>1</sup>, Т.В. Демидкина<sup>2</sup>** Влияние условий культивирования на экспрессию метионин-γ-лиазы *Clostridium sporogenes*. <sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; <sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
6. **Денисенко Ю.А.<sup>1</sup>, Волков П.В.<sup>1</sup>, Доценко А.С.<sup>1,2</sup>, Булахов А.Г.<sup>1</sup>, Зоров И.Н.<sup>1,2</sup>, Гусаков А.В.<sup>1,2</sup>, Рожкова А.М.<sup>1,2</sup>, Сеницын А.П.<sup>1,2</sup>** Свойства мутантных гемицеллюлаз *penicillium saepescens*. <sup>1</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
7. **Елизаров И.М.(1), Дергоусова Н.И.(2), Тихонова Т.В.(2), Ямскова О.В.(3), Гаврилов С.Н.(1)** Роль 11-гемового цитохрома в железоредукции у термофильной металл-восстанавливающей бактерии *Carboxydotherrmus ferrireducens*. (1) ФИЦ Биотехнологии РАН, институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН; (2) ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; (3) ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова
8. **Ельченинов А.Г.<sup>1</sup>, Menzel P.<sup>2</sup>, Gudbersdottir S.R.<sup>2</sup>, Krogh A.<sup>2</sup>, Бонч-Осмоловская Е.А.<sup>1</sup>, Кубланов И.В.** Анализ генома термофильного планктомицета

*Thermogutta terrifontis*. <sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

9. **Заюлина К.С.<sup>1</sup>, Гаврилов С.Н.<sup>1</sup>, Елизаров И.М.<sup>1</sup>, Кожевникова Д.А.<sup>1</sup>, Подосокорская О.А.<sup>1</sup>, Тощакон С.В.<sup>2</sup>, Бонч-Осмоловская Е.А.<sup>1</sup>, Кубланов И.В.<sup>1</sup>** Метаболизм сахаров двух новых гипертермофильных архей родов *Thermococcus* и *Pyrobaculum*. <sup>1</sup> Институт микробиологии им С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Балтийский Федеральный Университет им. И.Канта
10. **В. А. Иванов<sup>1,2</sup>, А. В. Комова<sup>1</sup> З. Б. Намсараев<sup>1</sup>** Молекулярное разнообразие и биогеография цианобактерий Антарктиды. <sup>1</sup> НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия; <sup>2</sup> Московский физико-технический институт, кафедра НБИК-технологий
11. **Ю.А. Франк, К.М. Климова, А.П. Лукина, Н.С. Каланда, О.В. Карначук** Устойчивость к металлам у представителей nitrospirae из глубинной биосферы. *Томский государственный университет, Томск, Россия*
12. **Е. П. Ветчинкина<sup>1</sup>, М. А. Купряшина<sup>1</sup>, В. Ю. Горшков<sup>2</sup>, Ю. В. Гоголев<sup>2</sup>, В. Е. Никитина<sup>1</sup>** Динамика активности ферментов фенолоксидазного комплекса ксилотрофных базидиомицетов. <sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия; <sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики КазНИЦ РАН, Казань, Россия
13. **А.А. Нешко<sup>1</sup>, Г.Л. Бурьгин<sup>1</sup>, Е.В. Крючкова<sup>1</sup>, М.А. Макашова<sup>2</sup>, О.В. Турковская<sup>1</sup>, С.Ю. Щеголев<sup>1,2</sup>** Таксономическая идентификация ризосферного изолята LСu2, устойчивого к мультзагрязнению. <sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия; <sup>2</sup>СНИГУ им. Н.Г.Чернышевского, Саратов, Россия
14. **А.А. Никитина, Ю.В. Литти, Д.А. Ковалев, А.А. Ковалев, А.Н. Ножевникова** Интенсификация и повышение стабильности процесса анаэробной переработки городских органических отходов. *ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия*
15. **Д. Е. Сидорова<sup>2</sup>, В. А. Плюта<sup>1</sup>, О. А. Кокшарова<sup>1,3</sup>, А. А. Попова<sup>1</sup>, И. А. Хмель<sup>1</sup>** Биологический синтез наночастиц серебра с использованием экстрактов растений. <sup>1</sup> ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва; <sup>2</sup> ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва; <sup>3</sup> ГУ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва
16. **Синетова М.А.<sup>1</sup>, Болатхан К.<sup>2</sup>, Заядан Б. К.<sup>2</sup>, Миронов К.С.<sup>1</sup>, Куприянова Е.В.<sup>1</sup>, Сидоров Р.А.<sup>1</sup>, Скрипник А. Н.<sup>1</sup>, Лось Д.А.<sup>1</sup>** Комплексная характеристика термоустойчивой цианобактерии *Desertifilum* sp. штамм Irpas В-1220 с высоким биотехнологическим потенциалом. <sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

РАН, Ботаническая ул., 35, 127276 Москва, Россия; <sup>2</sup>Кафедра биотехнологии, факультет биологии и биотехнологии Казахского Национального университета имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

17. **В.Ю. Ушаков<sup>1,2</sup>, Г.В. Смирнова<sup>2</sup>, О.Н. Октябрьский<sup>2</sup>** Сульфит-ион (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) как гипотетический антиоксидант в аэробно растущих культурах *Escherichia coli*. <sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия; <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
18. **Фролова А.А., Слободкина Г.Б., Слободкин А.И.** *Thermosulfurimonas litoralis*, sp.nov. – новая, анаэробная термофильная серо-диспропорционирующая бактерия из мелководных морских гидротерм. *ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*
19. **Т. А. Чуприянова<sup>2</sup>, В. А. Плюта<sup>1</sup>, И. А. Хмель<sup>1</sup>, А. А. Попова<sup>1</sup>, В. А. Липасова<sup>1</sup>** Влияние летучих органических соединений на индукцию окислительного стресса и устойчивость бактерий к антибиотикам. <sup>1</sup>ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

## Оглавление

АНТИМИКРОБНАЯ И АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЫЛЬЦЫ СОСНЫ <i>PINUS SYLVESTRIS</i> Д.В. Аксенов-Грибанов <sup>1,2</sup> , И.В. Войцеховская <sup>1</sup> , Е.С. Протасов <sup>1</sup> , М.В. Димова <sup>1</sup> , Ю.А. Лубяга <sup>1,2</sup> , Д.В. Лозовой <sup>1</sup> , Г.А. Скобин <sup>1</sup> , М.А. Тимофеев <sup>1</sup> .....	21
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ ДВУХ ШТАММОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОЗЕРА БЕЛОЕ (КОСИНСКОЕ ТРЕХОЗЕРЬЕ) А.Ю. Акулова <sup>1</sup> , К. А.Чеканов <sup>1</sup> , В. В. Ильинский <sup>1</sup> , Т. И. Комарова <sup>1</sup> , И. В. Лазебная <sup>2</sup> , Т. Р. Кравцова <sup>1</sup> , О. А. Кокшарова <sup>2,3</sup> .....	23
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА АРХИПЕЛАГА НОВАЯ ЗЕМЛЯ: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ А. А. Белов <sup>1</sup> <sup>1</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия .....	26
ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРЕГАЛОЗЫ В ЭКЗОГЕННО ПОКОЯЩИХСЯ И ПРОРАСТАЮЩИХ СПОРАХ ЗИГОМИЦЕТОВЫХ И АСКОМИЦЕТОВЫХ ГРИБОВ Д. А. Бокарева <sup>1,3</sup> , А. И. Усов <sup>2</sup> , Е. П. Феофилова <sup>1</sup> , И. С. Мысякина <sup>1</sup> .....	27
РАЗНООБРАЗИЕ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЕРИФЕРИЙНОГО МЕТАБОЛИЗМА, ИНДУЦИРУЮЩИХСЯ У АКТИНОБАКТЕРИЙ <i>RHODOCOCCLUS OPACUS</i> 1СР И <i>RHODOCOCCLUS WRATISLAVIENSIS</i> G10 ПРИ РОСТЕ НА БЕНЗОАТЕ НАТРИЯ О. В. Борзова <sup>1,2</sup> , И. П. Соляникова <sup>2</sup> , Е. С. Шумкова <sup>2,3</sup> , Е. В. Емельянова <sup>2</sup> , Н. В. Присяжная <sup>2</sup> , Д. О. Егорова <sup>4</sup> , Е. С. Корсакова <sup>4</sup> , Е. Г. Плотникова <sup>4</sup> , Л. А. Головлева <sup>2</sup> .....	31
НОВЫЙ ШТАММ АНАММОКС-БАКТЕРИИ <i>CANDIDATUS 'JETTENIA ASIATICA'</i> , ОТСЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫЙ В ХОДЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРОТОЧНЫХ УСЛОВИЯХ, И АКТИВНЫЙ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТОВ И рН. Бочкова Е. А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. ....	34
КОНСТРУИРОВАНИЕ УЛУЧШЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ. Булахов А.Г., Волков П.В., Гусаков А.В., Рожкова А.М. ....	36
НОВАЯ АНОКСИГЕННАЯ НИТЧАТАЯ ФОТОТРОФНАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННОГО ОЗЕРА КИРАН Бурганская Е.И., Гайсин В.А., Брянцева И.А. ....	37
УСТОЙЧИВОСТЬ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА <i>DESULFOVIBRIO</i> К АКТИВНЫМ ФОРМАМ КИСЛОРОДА И ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ Е. Г. Воробьева <sup>1</sup> , А. Л. Брюханов <sup>1,2</sup> .....	39
НОВЫЕ МЕЗОФИЛЬНЫЕ АНОКСИГЕННЫЕ НИТЧАТЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ В.А. Гайсин, И.А. Брянцева, А.М. Калашников, Д.С. Груздев, Е.И. Бурганская, М.В. Сухачева, Е.А. Волынчикова, Б.Б. Кузнецов и В.М. Горленко .....	42

АЦИДОТОЛЕРАНТНЫЙ ГРИБ РОДА <i>PENICILLIUM</i> , УСТОЙЧИВЫЙ К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	
Глухова Л.Б. <sup>1</sup> , Груздев Е.В. <sup>2</sup> , Белецкий А.В. <sup>2</sup> , Стрелкова Е.В. <sup>1</sup> , Карначук О.В. <sup>1</sup> , Равин Н.В. <sup>2</sup> , Марданов А.В. <sup>2</sup> .....	44
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАГЕНОМНОГО ПОДХОДА И ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА МИКРОБИОМА ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО В РОССИИ	
М.А. Горбачева .....	45
АНАЛИЗ ФИЛОГЕНИИ ФОТОТРОФНЫХ <i>CHLOROFLEXI</i> С ПРИМЕНЕНИЕМ ХАРАКТЕРНОГО ПРОФИЛЯ ДЕЛЕЦИЙ И ИНСЕРЦИЙ В БЕЛКОВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ	
Д.С. Груздев*, В.А. Гайсин .....	49
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ МЕТИОНИН- $\gamma$ -ЛИАЗЫ <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i>	
Д.Ж. Давыдов <sup>1</sup> , Н.В. Ануфриева <sup>2</sup> , Е.А. Морозова <sup>2</sup> , В.С. Покровский <sup>1</sup> , Т.В. Демидкина <sup>2</sup> ...	52
СВОЙСТВА МУТАНТНЫХ ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗ <i>PENICILLIUM CANESCENS</i>	
Денисенко Ю.А. <sup>1</sup> , Волков П.В. <sup>1</sup> , Доценко А.С. <sup>1,2</sup> , Булахов А.Г. <sup>1</sup> , Зоров И.Н. <sup>1,2</sup> , .....Гусаков А.В. <sup>1,2</sup> , Рожкова А.М. <sup>1,2</sup> , Сеницын А.П. <sup>1,2</sup> .	54
АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ ШТАММОВ <i>ARTHROBACTER AGILIS</i> LUSH13 И <i>MICROBACTERIUM SPECIES</i> B51 В МОДЕЛЬНЫХ СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ	
Н. С. Егозарьян <sup>1,3</sup> , И. П. Соляникова <sup>1</sup> , Н. Е. Сузина <sup>1</sup> , В. Н. Поливцева <sup>1</sup> , Л. А. Головлёва <sup>1</sup> , А. Л. Мулюкин <sup>2</sup> , Г. И. Эль-Регистан <sup>2</sup> .....	55
РОЛЬ 11-ГЕМОВОГО ЦИТОХРОМА В ЖЕЛЕЗОРЕДУКЦИИ У ТЕРМОФИЛЬНОЙ МЕТАЛЛ-ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ БАКТЕРИИ <i>CARBOXYDOTHERMUS FERRIREDUCTENS</i>	
Елизаров И.М.(1), Дергоусова Н.И.(2), Тихонова Т.В.(2), Ямскова О.В.(3), Гаврилов С.Н.(1).....	59
АНАЛИЗ ГЕНОМА ТЕРМОФИЛЬНОГО ПЛАНКТОМИЦЕТА <i>THERMOGUTTA TERRIFONTIS</i>	
Ельченинов А.Г. <sup>1</sup> , Menzel P. <sup>2</sup> , Gudbersdottir S.R. <sup>2</sup> , Krogh A. <sup>2</sup> , Бонч-Осмоловская Е.А. <sup>1</sup> , Кубланов И.В. <sup>1</sup> .....	60
ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ ИЗ ШТАММОВ <i>ACINETOBACTER LWOFFII</i>	
Ермакова А.Я. <sup>1</sup> , Белецкий А.В. <sup>1</sup> , Ракитин А.Л. <sup>1</sup> , Петрова М.А. <sup>2</sup> , Марданов А.В. <sup>1</sup> .....	61
УСТОЙЧИВОСТЬ К ИОНАМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ШТАММОВ АРХЕЙ РОДА <i>ACIDIPLASMA</i>	
Т. В. Ерофеева <sup>1</sup> .....	62
МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НОВОЙ ПСИХРОАКТИВНОЙ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ	
В. А. Зайчиков <sup>1</sup> , Ю. Ю. Берестовская <sup>2</sup> , Л. В. Васильева <sup>2</sup> , А. М. Семенов <sup>1</sup> .....	66
МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОГЕОГРАФИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ АНТАРКТИДЫ	



В. А. Иванов <sup>1,2</sup> , А. В. Комова <sup>1</sup> З. Б. Намсараев <sup>1</sup> .....	67
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ ТУНДРОВЫХ ЭКОСИСТЕМ СУБАРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ РОССИИ	
А.А. Иванова <sup>1</sup> , И.С. Куличевская <sup>1</sup> , С.Н. Дедыш <sup>1</sup> .....	69
ПРОДУКЦИОННЫЕ И ДЕСТРУКЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ СОЛОНОВОДНЫХ РЕК ПРИЭЛЬТОНЬЯ	
Канапацкий Т.А., Самылина О.С. ....	72
УСТОЙЧИВОСТЬ К МЕТАЛЛАМ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ NITROSPIRAE ИЗ ГЛУБИННОЙ БИОСФЕРЫ	
Ю.А. Франк, К.М. Климова, А.П. Лукина, Н.С. Каланда, О.В. Карначук .....	74
БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК НОВЫХ ЛАККАЗ У АКТИНОБАКТЕРИЙ	
А. И. Конев <sup>1</sup> , М. С. Куюкина <sup>1,2</sup> , И. Б. Ившина <sup>1,2</sup> .....	78
ОТ ЛИТОТРОФИИ ДО ГИДРОЛИЗА СЛОЖНЫХ ПОЛИМЕРОВ: МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ РОДА <i>THERMOFILUM</i>	
Т.В. Кочеткова <sup>1</sup> , О.А. Подосокорская <sup>1</sup> , А.В. Лебединский <sup>1</sup> , С.В. Тошаков <sup>2</sup> , И.В. Кубланов <sup>1</sup> .....	81
РАЗНООБРАЗИЕ МИКОБИОТЫ АРИДНЫХ ПОЧВ КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ ЭУКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ В МОДЕЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ МАРСА	
Крючкова М.О. <sup>1</sup> , Иванова А.Е. <sup>1</sup> , Воробьева Е.А. <sup>1,4</sup> , Чепцов В.С. <sup>1</sup> , Павлов А.К. <sup>2</sup> , Ломасов В.Н. <sup>3</sup> .....	84
ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ	
Е. П. Ветчинкина <sup>1</sup> , М. А. Купряшина <sup>1</sup> , В. Ю. Горшков <sup>2</sup> , Ю. В. Гоголев <sup>2</sup> , В. Е. Никитина <sup>1</sup> .....	86
БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ	
М. А. Купряшина, Е. П. Ветчинкина, Е. А. Лощина, А. М. Буров. В. Е. Никитина .....	89
ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ	
А. А. Мельникова <sup>1</sup> , А. В. Комова <sup>1</sup> , Р. Г. Василев <sup>1,2</sup> , Д. Д. Цыренова <sup>3</sup> , В. Б. Дамбаев <sup>3</sup> , О. П. Дагурова <sup>3</sup> , Д. Д. Бархутова <sup>3</sup> , М. А. Петрушкина <sup>4,5</sup> , Д. В. Кузьмин <sup>4</sup> , В. А. Винокуров <sup>5</sup> , Х. М. Кадиев <sup>6</sup> , А. В. Волков <sup>6</sup> , А. У. Дандаев <sup>6</sup> , З. Б. Намсараев <sup>1</sup> .....	92
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АРХЕЙ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ КАМЧАТКИ	
А.Ю. Меркель <sup>1</sup> , И.Ю. Тарновецкий <sup>1,2</sup> , А.А. Перевалова <sup>1</sup> , Е.А. Бонч-Осмоловская <sup>1</sup> .....	95
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДОВ <i>TETRACYSTIS</i> И <i>SPONGIOSOCUM</i> В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	
С. В. Москаленко, А. Д. Темралеева.....	97

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ РИЗОСФЕРНОГО ИЗОЛЯТА <i>LCu2</i> , УСТОЙЧИВОГО К МУЛЬТИЗАГРЯЗНЕНИЮ	
А.А. Нешко <sup>1</sup> , Г.Л. Бурьгин <sup>1</sup> , Е.В. Крючкова <sup>1</sup> , М.А. Макашова <sup>2</sup> , О.В. Турковская <sup>1</sup> , С.Ю. Щеголев <sup>1,2</sup> .....	100
ИНТЕНСИФИКАЦИЯ И ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ГОРОДСКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ	
А.А. Никитина, Ю.В. Литти, Д.А. Ковалев, А.А. Ковалев, А.Н. Ножевникова.....	104
МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ ПРЕДОТВРАЩАЮТ И ОБРАЩАЮТ ФРАГМЕНТАЦИЮ МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ <i>DIPODASCUS MAGNUSII</i> .	
А.П. Овченкова <sup>1</sup> , Т.Н. Голева <sup>1</sup> , А.Г. Рогов <sup>1</sup> .....	106
АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЛИШАЙНИКОВ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ И ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	
Я. А. Ахременко <sup>1</sup> , И. А. Прокопьев <sup>2</sup> , А. А. Поляниченко <sup>1</sup> , А. А. Федоров <sup>1</sup> .....	110
ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ БЕТА-N-МЕТИЛАМИН-L-АЛАНИНА (БМАА)	
Попова А.А. <sup>1</sup> , Цитрина А.А. <sup>2</sup> , Кокшарова О.А. <sup>1,3</sup> .....	112
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА КРАХМАЛОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ НА БИОСИНТЕЗ ТАКРОЛИМУСА (FK-506) ШТАММОМ <i>STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS</i> ВКМ АС-2618Д	
В.Ю. Пошехонцева <sup>1,2</sup> , В.В. Фокина <sup>1</sup> , А.А. Шутов <sup>1</sup> , М.В. Донова <sup>1</sup> .....	115
ОЦЕНКА АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭНДЕМИЧНЫХ И ГЛУБОКОВОДНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД	
Е.С. Протасов <sup>1</sup> , Д.В. Аксенов-Грибанов <sup>1,2</sup> , И.В. Войцеховская <sup>1</sup> , Мадьярова Е.В. <sup>1</sup> , Широкова Ю.А. <sup>1</sup> , Скобин Г.А. <sup>1</sup> , Ржечицкий Я.А. <sup>1</sup> , Димова М.Д., М.А. Тимофеев <sup>1</sup> .....	119
<i>MYROTHESCIUM RORIDUM</i> – ПРОДУЦЕНТ ГОЛУБОЙ ОКСИДАЗЫ, АКТИВНОЙ В НЕЙТРАЛЬНО-ЩЕЛОЧНЫХ УСЛОВИЯХ	
Ренфельд Ж.В. <sup>1,2</sup> , Коломыцева М.П. <sup>1</sup> , Мясоедова Н.М. <sup>1</sup> , Самойлова А.С. <sup>1</sup> , Подъяблонская Е.В. <sup>1</sup> , Головлева Л.А. <sup>1</sup> .....	121
РАЗРАБОТКА ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА <i>STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS</i> – ПРОДУЦЕНТА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ РАПАМИЦИНА	
В.В. Савельева <sup>1</sup> , Т.М. Воинова <sup>2</sup> , Е.В. Глаголева <sup>1</sup> В.В. Джавахия <sup>1</sup> .....	122
ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ ИЗ ВОДЫ И СЕДИМЕНТОВ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ	
О.И. Сазонова, А.Б. Гафаров, Н.В. Присяжная, А.А. Иванова, С.Л. Соколов .....	124
РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДА АПТАМЕРНОГО АНАЛИЗА ОХРАТОКСИНА А НА ОСНОВЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ	
А.В. Самохвалов, И.В. Сафенкова .....	127
БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ	

Д. Е. Сидорова <sup>2</sup> , В. А. Плюта <sup>1</sup> , О. А. Кокшарова <sup>1,3</sup> , А. А. Попова <sup>1</sup> , И. А. Хмель <sup>1</sup> .....	128
КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРМОУСТОЙЧИВОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ <i>DESERTIFILUM</i> SP. ШТАММ IPPAS B-1220 С ВЫСОКИМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ.	
Синетова М.А. <sup>1</sup> , Болатхан К. <sup>2</sup> , Заядан Б. К. <sup>2</sup> , Миронов К.С. <sup>1</sup> , Куприянова Е.В. <sup>1</sup> , Сидоров Р.А. <sup>1</sup> , Скрипник А. Н. <sup>1</sup> , Лось Д.А. <sup>1</sup> .....	130
РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ ГЛЮКОКИНАЗ У МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ	
Н. П. Солнцева <sup>1,2</sup> , О. Н. Розова <sup>1</sup> , И. И. Мустахимов <sup>1,2</sup> , А. С. Решетников <sup>1</sup> , В. Н. Хмеленина <sup>1</sup> .....	131
МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИНЕРАЛОВ КАРБОНАТНО-СИЛИКАТНЫХ ПОРОД	
Сорокина А.В. <sup>1</sup> , Щербакова Т.А. <sup>2</sup> , Синягина М.И. <sup>3</sup> , Маркелова М.И. <sup>3</sup> , Шарипова М.Р. <sup>1</sup> , Хиляс И.В. <sup>1</sup> .....	134
ПОЧВЕННЫЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ РОДА <i>NOSTOC</i> : МОРФОЛОГИЯ, ФИЛОГЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ	
Темралеева А.Д. <sup>1</sup> , Дидович С.В. <sup>2</sup> .....	136
НОВЫЙ АНТИБИОПЛЕНОЧНЫЙ АГЕНТ – НИКЛОЗАМИД	
Н. А. Тетенева, М. В. Журина, А. В. Ганнесен, С. В. Мартьянов, В. К. Плакунов .....	140
СУЛЬФИТ-ИОН (SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) КАК ГИПОТЕТИЧЕСКИЙ АНТИОКСИДАНТ В АЭРОБНО РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	
В.Ю. Ушаков <sup>1,2</sup> , Г.В. Смирнова <sup>2</sup> , О.Н. Октябрьский <sup>2</sup> .....	142
<i>THERMOSULFURIMONAS LITORALIS</i> , SP.NOV. – НОВАЯ, АНАЭРОБНАЯ ТЕРМОФИЛЬНАЯ СЕРО-ДИСПРОПОРЦИОНИРУЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ МЕЛКОВОДНЫХ МОРСКИХ ГИДРОТЕРМ	
Фролова А.А., Слободкина Г.Б., Слободкин А.И. ....	144
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.	
Д. И. Хватов <sup>1</sup> , О. И. Верная <sup>2</sup> , В.П. Шабатин <sup>2</sup> , А.М. Семенов <sup>1</sup> , Т.И. Шабатина <sup>2</sup> , А.Н. Бородин <sup>2</sup> , М.А. Марков <sup>2</sup> .....	145
ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ИНДУКЦИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ.	
Т. А. Чуприянова <sup>2</sup> , В. А. Плюта <sup>1</sup> , И. А. Хмель <sup>1</sup> , А. А. Попова <sup>1</sup> , В. А. Липасова <sup>1</sup> .....	146
ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ РОДА <i>NOSTOC</i> SP. (CYANOBACTERIA)	
Шалыгина Р.Р. <sup>1</sup> , Шалыгин С.С. <sup>2,3</sup> , Редькина В.В. <sup>1</sup> .....	148
ТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВИРУС-ЗАРАЖЕННЫХ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ, ОБРАБОТАННЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫМ АГЕНТОМ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	
Р. Шах Махмуд <sup>1,2</sup> , В. В. Ульянова <sup>1</sup> , М. И. Маркелова <sup>1</sup> , О. С. Козлова <sup>1</sup> , А. Мостафа <sup>2,3</sup> , О. Н. Ильинская <sup>1</sup> .....	149

ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ  
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПОЧВЕННОЙ САПРОФАГИЧЕСКОЙ  
МЕЗОФАУНЫ

А.В. Якушев .....151

ОТВЕТ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* НА КОМБИНИРОВАННОЕ  
ДЕЙСТВИЕ ТЕПЛОВОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО ШОКОВ

Е. А. Януцевич<sup>1</sup>, Н. А. Синицына<sup>2</sup>, В. М. Терёшина<sup>1</sup> .....156

## АНТИМИКРОБНАЯ И АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЫЛЬЦЫ СОСНЫ *PINUS SYLVESTRIS*

Д.В. Аксенов-Грибанов<sup>1,2</sup>, И.В. Войцеховская<sup>1</sup>, Е.С. Протасов<sup>1</sup>, М.В. Димова<sup>1</sup>, Ю.А. Лубяга<sup>1,2</sup>, Д.В. Лозовой<sup>1</sup>, Г.А. Скобин<sup>1</sup>, М.А. Тимофеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ биологии ФГБОУ ВО «ИГУ»

<sup>2</sup> АНО Байкальский исследовательский центр

Актинобактерии представляют собой группу почвенных микроорганизмов, которые за последние десятилетия неоднократно зарекомендовали себя как эффективные продуценты биологически активных молекул (Goldman et al., 2015). Так, актинобактерии являются продуцентами витаминов, антибиотиков, иммуномодуляторов и других значимых в жизнедеятельности человека соединений. Однако, ввиду растущей проблемы антибиотикорезистентности, актуальным направлением разработок является поиск новых штаммов-продуцентов. Ввиду того, что большинство наземных (почвенных) ресурсов штаммов зачастую исчерпали себя, большой интерес представляет выделение новых штаммов и оценка их биосинтетического потенциала из нетривиальных источников.

В ходе настоящего исследования проведено выделение новых и редких штаммов актинобактерий из пыльцы сосны *Pinus sylvestris*, оценена антимикробная активность штаммов против модельных тест культур грамположительных и грамотрицательных бактерий и дрожжей.

Выделение чистых культур штаммов актинобактерий выполнено на твердых питательных средах MS и агар Чапека при 28 °С с добавлением антибиотиков циклогесимида (50 мкг/мл) и фосфомицина (100 мкг/мл). Идентификацию штаммов проводили по гену 16S рНК. Нуклеотидные последовательности изолятов размещены в GenBank под номерами KU25264-KU252672, KU168611-KU168614, KU1413157-KU141361.

Для культивирования микроорганизмов использовали питательные среды NL-19, DNPM, SG, ISP. Метаболиты из культуральной жидкости экстрагировали этилцетатом, а из биомассы - смесью растворителей ацетон:метанол (Sarker et al., 2005). Кроме того, у выделенных штаммов оценили актирадикальную активность экстрактов при культивировании на среде NL-19.

Один из наиболее активных штаммов (*Streptomyces sp. IB2014173-3*) был культивирован на среде ISP для хроматомасспектрометрического анализа и дерепликации известных соединений. Антимикробная активность экстрагированных метаболитов проанализирована с помощью диск-диффузионного метода в отношении *Bacillus subtilis*

ATCC 6633, *Pseudomonas putida* KT 2440, *Escherichia coli* ATCC25922, *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 и *Candida albicans* DSM1665.

Проведенный скрининг выявил 18 штаммов актинобактерий на основе морфологических характеристик. Филогенетический анализ выделенных штаммов на основе гена 16S рРНК показал, что 14 из 18 штаммов относятся к роду *Streptomyces*. Остальные четыре штамма представлены родами *Micromonospora*, *Rhodococcus* и *Amurolatopsis*.

Оценивая антирадикальную активность штаммов установлено, что штамм *Streptomyces* sp. IB2014I74-7HS проявил максимальную активность ( $6,89 \pm 0,03$  мг/мл), что сравнимо с антирадикальной активностью флавоноидов лютеолин-5-О- глюкозида ( $5,73 \pm 0,13$  мг/мл) и кверцетегетина ( $9,02 \pm 0,16$  мг/мл) (Seyoum et al. 2006).

Оценивая антимикробную активность штаммов, установлено, что все выделенные штаммы характеризовались выраженной и специфической антагонистической активностью против бактерий и грибов. Обнаружено, что несколько штаммов проявляли выраженную антагонистическую активность против грибов *C. albicans*, но не ингибировали рост *S. cerevisiae*.

В ходе анализа культуральной жидкости штамма *Streptomyces* sp. IB2014I74-3 обнаружены как известные ( $n = 8$ ), так и неизвестные соединения ( $n = 51$ ). Среди известных соединений были обнаружены соединения семейства сафрамицинов, (Сафрамицин Y3, S, A), гальтамицинон, платенсин, антибиотик SS8201B и стрептотрицин.

Таким образом, принимая во внимание выраженную антимикробную и антирадикальную активность штаммов, нами показана потенциальная защитная роль актинобактерий в защите пыльцы сосны *P. sylvestris* от фитопатогенов.

Исследование проведено при частичной финансовой поддержке проекта МИНОБРНАУКИ РФ (№6.382.2014/К, 6.734.2016DAAD, 6.696.2016DAAD), Российским фондом фундаментальных исследований (проекты N 16-34-00686), грантом Иркутского государственного университета для поддержки молодых ученых и Немецкой службы академических обменов.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ ДВУХ ШТАММОВ  
УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОЗЕРА БЕЛОЕ  
(КОСИНСКОЕ ТРЕХОЗЕРЬЕ)**

**А.Ю. Акулова<sup>1</sup>, К. А.Чеканов<sup>1</sup>, В. В. Ильинский<sup>1</sup>, Т. И. Комарова<sup>1</sup>, И. В. Лазебная<sup>2</sup>,  
Т. Р. Кравцова<sup>1</sup>, О. А. Кокшарова<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Биологический ф-т Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;  
Ленинские горы, 1, 12, 119991 Москва, Россия, e-mail: skuroy-92@mail.ru

<sup>2</sup>Институт общей генетики имени Н.И.Вавилова, РАН, ул. Губкина, 3, 119333, Москва,  
Россия

<sup>3</sup>НИИФХБ Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Ленинские  
горы, 1, 40, 119991 Москва, Россия, e-mail: [OA-Koksharova@rambler.ru](mailto:OA-Koksharova@rambler.ru)

С расширением границ Москвы Косинские озера (Косино-Ухтомский район Москвы, 55°43'09" с. ш. 37°51'26" в. д.) оказались в условиях быстро нарастающего антропогенного воздействия, приводящего к разрастанию цианобактерий, продуцирующих токсины (например, такие как микроцистины, БМАА), а также к загрязнению углеводородами нефти и нефтепродуктов. Основной вклад в процесс естественной утилизации углеводородов вносят углеводородокисляющие бактерии, способные использовать широкий спектр органических веществ, в том числе и углеводороды, в качестве единственного источника углерода и энергии. В связи с этим идентификация состава углеводородокисляющих бактерий Косинских озер представляет особый интерес.

Из поверхностного слоя воды Косинских озер в прибрежной части озера Белое в апреле 2012 года выделены в культуру штаммы бактерий 2012А и 2012В (А.Ю. Акулова, Т.В. Комарова, В.В. Ильинский, и др.). Идентификацию исследуемых штаммов проводили путем анализа нуклеотидной последовательности гена малой субъединицы бактериальной рибосомы *16SpPHK*. Выделение геномной ДНК из клеток бактерий проводили согласно методике (Koksharova et al., 1998). Амплификацию последовательности гена *16SpPHK* осуществляли путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров (Widmer et al., 1998; Fredriksson et al., 2013) и секвенировали на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) в ЦКП «Геном». Поиск гомологов осуществлялся при помощи программы BLAST в базе данных GenBank. В результате ПЦР получены фрагменты ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности, соответствующие гену *16SpPHK* длиной 1510 п.н. и 1479 п.н. для

штаммов 2012А и 2012В соответственно. Последовательности *16SpPHK* штаммов 2012А и 2012В депонированы в базу данных GenBank с идентификаторами KR422621.1 и KP779654.1 соответственно. Установлено, что последовательность *16SpPHK* штамма 2012А имела наибольшую идентичность с таковой для представителей рода *Stenotrophomonas* (Proteobacteria, Xanthomonadaceae). Наиболее высокую степень сходства (идентичность 95%; перекрытие 99%-100%) последовательность *16SpPHK* штамма 2012А имела с таковыми для *Stenotrophomonas maltophilia* IAM 1566 (AB294555.1), *S. maltophilia* IARI-ABL-34 (KC581677.1), *S. maltophilia* R551-3 (CP001111.1). С идентичностью 91% и выше – со штаммами *Pseudomonas parafulva* AJ 2129 (AB060132.1), *P. chlororaphis* ATCC 33663 (AB021412.1), *P. savastanoi* ATCC 13522 (AB021402.1), *P. syringae* (AB001447.1), *P. syringae* (AB001445.1). Таким образом, путем сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена *16SpPHK* различных представителей Xanthomonadaceae установлено, что данный штамм наиболее близок роду *Stenotrophomonas*. Ближайшие родственники штамма 2012А обитают в широком диапазоне экологических ниш, охватывающих несколько материков. Филогенетические деревья были построены с помощью алгоритмов Ближайшего соседа (NJ) (Saitou, Nei, 1987) и Максимального правдоподобия (ML) (Felsenstein, 1981) с параметрами по умолчанию. Для построения филогенетического дерева *Stenotrophomonas* sp. 2012А были взяты 49 нуклеотидных последовательностей гена *16SpPHK*, принадлежащих бактериям из филума Proteobacteria. Множественное выравнивание и построение филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA 6.06. Филогенетический анализ последовательностей гена *16SpPHK* показал, что *Stenotrophomonas* sp. 2012А образует собственную ветвь и не кластеризуется ни с одним из родов семейства Xanthomonadaceae. Самая высокая идентичность (97%) последовательности штамма 2012А наблюдалась с последовательностью некультивируемой бактерии, обозначенной как nbt01h05 (EU535347.1), однако процент перекрытия последовательностей был низок (93%). Следовательно, сделать заключение о принадлежности штамма 2012А к одному виду или роду нельзя.

Для построения филогенетического дерева для *Rhodococcus* sp. 2012В были использованы нуклеотидные последовательности гена *16SpPHK* наряду с соответствующими 42 нуклеотидными последовательностями из GenBank, принадлежащими к Actinobacteria. Последовательность гена *16SpPHK* *Rhodococcus* sp. 2012В попадает в отдельный кластер, сформированный бактериями *Rhodococcus* spp. и поддерживается тремя референтными штаммами – *R. qingshengii* dj1-6 (NR\_043535.1), *R. jialingiae* dj1-6-2 (NR\_115708.1) и *R. erythropolis* DSM 43066<sup>T</sup>(X79289). Максимальная



степень сходства у *Rhodococcus* sp. 2012В выявлена со штаммом *R. erythropolis* NVI 00/50/667 (AY147876/1) (идентичность 99%; перекрытие 100%), выделенным из организма рыбы, обитающей в Норвежском море и с референтным штаммом *R. erythropolis* DSM 43066<sup>T</sup>(X79289). Два других референтных карбендазим-деградирующих штамма – *R. qingshengii* dj1-6 (NR\_043535.1) и *R. jialingiae* dj1-6-2 (NR\_115708.1) имели явные морфологические и биохимические отличия от *Rhodococcus* sp. 2012В. По данным морфологии и физиолого-биохимических характеристик штамм *Rhodococcus* sp. 2012В был отнесен к виду *R. erythropolis*.

С помощью ПЦР при использовании праймеров (Kohn et al., 2002) получена нуклеотидная последовательность длиной 333 п.н для штамма 2012В, соответствующая фрагменту гена *alkB*, продукт которого катализирует реакцию в метаболическом пути деградации углеводов (алканмонооксигеназу, обеспечивающую окисление *n*-алканов с длиной углеводородной цепи от C<sub>6</sub> до C<sub>12</sub>). Последовательность гена *alkB* депонирована в GenBank с идентификатором KR422620.1. Наличие гена *alkB* у штамма 2012В может указывать на его способность к окислению углеводов.

Способность *Stenotrophomonas* sp. 2012А к разрушению алифатических углеводов установлена на основании способности этой бактерии к росту на твердой синтетической среде ММС, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии дизельное топливо.

Итак, полученные результаты дают возможность предположить, что в геноме *Stenotrophomonas* sp. 2012А присутствуют гены, кодирующие ферменты, отвечающие за окисление «коротких» алканов.

Таким образом, на основании исследования первичной структуры нуклеотидных последовательностей гена *16SpPHK* было определено таксономическое положение штамма 2012В, а штамм 2012А может быть представителем нового, не описанного ранее, рода углеводородокисляющих бактерий.

Работа выполнена при частичной поддержке проекта РФФИ № 14-04-00656а

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА АРХИПЕЛАГА НОВАЯ ЗЕМЛЯ:  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ**

**А.А.Белов<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**

Последние годы одной из передовых задач микробной экологии является задача исследования микроорганизмов и микробных сообществ в экстремальных местообитаниях Земли. Обнаружение жизнеспособных прокариот в разнообразных экосистемах Земного шара, характеризующихся агрессивными условиями среды, в совокупности с результатами космических исследований, подвели современную микробиологию вопросу о существовании биологических форм жизни во внесемных условиях. В качестве модельных организмов для изучения возможных форм жизни вне Земли изучаются обитатели экстремальных местообитаний, адаптировавшие свой метаболизм к существованию в условиях воздействия одного или нескольких стрессовых факторов. Исключительный интерес представляет изучение микроорганизмов-экстремофилов, длительное время пребывавших в состоянии глубокого анабиоза в условиях постоянных отрицательных температур, обнаружение новых устойчивых видов, изучение процессов адаптации клетки в естественной среде обитания, оценка пределов устойчивости бактериальных клеток.

Целью настоящей работы была микробиологическая характеристика почти не изученного с точки зрения микробиологии архипелага Новая Земля, определение границ устойчивости к температуре и рН среды. Особый интерес в изучении бактериального населения этого архипелага обусловлен многочисленными ядерными испытаниями, проводимыми на этой территории, как возможного фактора мутагенеза и появления дополнительных свойств устойчивости клеток к физико-химическим воздействиям<sup>7</sup>

В задачи исследования входило: анализ аэробных гетеротрофных бактериальных сообществ льда, ледогрунта и поверхностного мелкозема, оценка обилия и биоразнообразия прокариот при варьировании температуры культивирования и рН среды, выделение чистых культур гетеротрофных бактерий, исследование их устойчивости к температуре и рН, создание банка культур бактерий-экстремофилов, устойчивых в широком диапазоне температур и рН.

Установлена достаточно высокая обогащенность микроорганизмами экотопов Новой Земли. Общая численность бактерий в ледогрунте Новой Земли составляет  $1,0 \cdot 10^8 \pm 0,4 \cdot 10^8$

кл/г. При этом число репродуцирующих на питательных средах клеток (КОЕ) при 25°C составило  $2,32 \cdot 10^7 \pm 0,16 \cdot 10^7$  кл/г, что подтверждает характерный для арктических осадков высокий потенциал активности, в отличие от микробных сообществ, населяющих поверхностные и глубинные экотопы Антарктиды. Гетеротрофные бактериальные сообщества Новой Земли умеренно разнообразны. В чистую культуру изолировано 75 штаммов, для которых определены температурные и pH границы роста. Значительная часть культур способны к активной жизнедеятельности при температуре от 4 до 40°C и в диапазоне pH от 3 до 12 единиц, что свидетельствует о развитии адаптивной устойчивости популяций и сообществ в целом к множественным стрессам. Обнаружены штаммы способные к росту при температурах от 4 до 50°C и при pH от 2 до 12 единиц. Проведена родовая идентификация доминирующих в образцах и устойчивых в широком диапазоне температуры и pH культур методом секвенирования гена 16S рРНК. В настоящее время проводится видовая идентификация культур бактерий.

## **ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРЕГАЛОЗЫ В ЭКЗОГЕННО ПОКОЯЩИХСЯ И ПРОРАСТАЮЩИХ СПОРАХ ЗИГОМИЦЕТОВЫХ И АСКОМИЦЕТОВЫХ ГРИБОВ**

**Д. А. Бокарева<sup>1,3</sup>, А. И. Усов<sup>2</sup>, Е. П. Феофилова<sup>1</sup>, И. С. Мысякина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Грибной морфогенез сопровождается изменениями в содержании особого дисахарида – трегалозы, который считается антагонистом ростовых процессов; он образуется и накапливается в процессе спорообразования и в стрессовых условиях. Процесс выхода спор из состояния покоя имеет большое значение в жизненном цикле всех мицелиальных грибов, однако его молекулярные механизмы во многом до сих пор неясны. Установлено, что в процессе прорастания асков дрожжей до 80% накопленной трегалозы превращается в глюкозу, которая, однако, не используется на ростовые процессы [1], а оставшиеся 20% трегалозы образуют компартиментализованный пул. Более того, этот дисахарид активно удаляется из клеток при прорастании спор: трегалоза под действием фермента трегалазы расщепляется до глюкозы, а далее превращается в

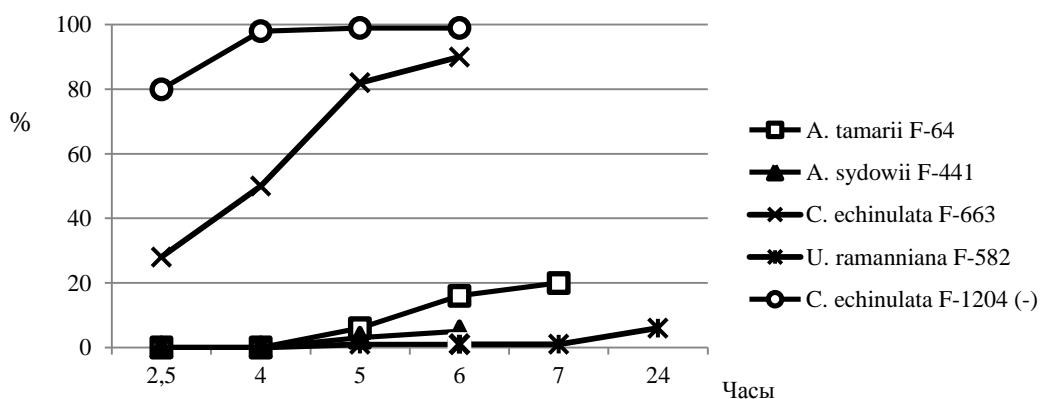
глицерин, который достаточно быстро выводится из клеток. В то же время глюкоза, полученная из трегалозы под действием фермента трегалазы, используется как резерв углерода при хранении спор, находящихся в состоянии экзогенного покоя: содержание трегалозы постепенно уменьшается, и она используется на поддержание экзогенного покоя (этот дисахарид называют «сахаром покоя»).

Ранее нами было проведено сравнительное исследование прорастания спор бесполого спороношения (конидий и спорангиоспор) и определение особенностей выхода их из состояния покоя у представителей мицелиальных грибов аскомицетного аффинитета *Aspergillus tamaris* и *A. sydowii*, а также зигомицетовых грибов – *Cunninghamella echinulata* и *Umbelopsis ramanniana*. Было показано, что споры изученных штаммов находятся в состоянии экзогенного покоя и имеют разные длительность лаг-фазы и скорость прорастания, которые зависят от наличия питательных веществ в среде [2]. Представляло интерес изучить процесс выхода спор из экзогенного покоя в среде, не содержащей экзогенных питательных веществ.

Цель работы – исследовать изменение содержания трегалозы в экзогенно покоящихся и прорастающих в дистиллированной воде конидиях и спорангиоспорах вышеуказанных мицелиальных грибов, имеющих разные скорости прорастания.

В работе использовали 5 штаммов из коллекции мицелиальных грибов ВКМ РАН, характеризующихся разной скоростью роста: высокой – *Aspergillus tamaris* F-64, *Cunninghamella echinulata* F-663, *Cunninghamella japonica* (нынешнее название *C. echinulata*) F-1204 (–), и низкой – *Aspergillus sydowii* F-441, *Umbelopsis ramanniana* F-582. Выращивание грибных культур, получение и проращивание спор в дистиллированной воде без использования питательных веществ, а также выделение и определение содержания трегалозы методом ГЖХ ее ТМС-производных проводили, как описано в работе [3]. Покоящиеся споры условно обозначали как "споры 0", проросшие споры – "споры П".

В результате проращивания спор в среде, не содержащей питательные вещества (дистиллированной воде) было установлено, что споры всех исследуемых грибов находились в состоянии экзогенного покоя, однако для выхода из него (стадия появления ростовых трубок) одним их представителям требуется совсем немного времени (1–2 ч), а другим – около суток (рисунок).



Проращение спор грибов в дистиллированной воде, %.

Исследование изменения в содержании трегалозы – сахара покоя – показало, что ее уровень в покоящихся спорах значительно варьирует даже у родственных штаммов грибов – как у аспергиллов, так и у зигомицетовых (таблица). Кроме того, у обоих штаммов *C. echinulata*, а также у *U. ramanniana*, несмотря на очевидные различия в скорости прорастания спор, содержание трегалозы в проросших спорах снижалось, а у штаммов аскомицетного аффинитета, также имеющих в "спорах 0" различия в уровне трегалозы, в процессе прорастания ее содержание либо оставалось неизменным, либо увеличивалось.

Содержание трегалозы в покоящихся и проросших спорах (в % от сухой биомассы)

Штамм	Покоящиеся споры ("споры 0"), (часы)	Проросшие споры ("споры П"), (часы)
<i>Aspergillus tamaris</i> F-64	5.62 (0 ч)	5.64 (24 ч)
<i>A. sydowii</i> F-441	2.47 (0 ч)	3.07 (28 ч)
<i>Cunninghamella echinulata</i> F-663	8.87 (0 ч)	7.47 (4 ч)
<i>C. echinulata</i> F-1204 (-)	7.04 (0 ч)	6.52 (3 ч)
<i>Umbelopsis rammaniana</i> F-582	0.34 (0 ч)	0.31 (28 ч)

Таким образом, в случае исследуемых представителей рода *Aspergillus* наблюдались изменения, отличные от ожидаемых. Не исключено, что метаболизм трегалозы у этих штаммов имеет особенности, связанные с устойчивостью к стрессу окружающей среды. Известно, что при незапрограммированном стрессе (каким может быть полное отсутствие в среде питательных веществ) организму необходимо остановить (или замедлить)

процессы роста и пролиферации, повысив, или, по меньшей мере, стабилизировав уровень трегалозы для предотвращения роста мицелия в неблагоприятных условиях. Известно, что представители р. *Aspergillus* проявляют повышенную стрессоустойчивость, например, к действию температурных и осмотических стрессоров [4]. В частности, среди использованных нами в работе штаммов представители вида *A. sydowii* часто выделяются из эстремальных местообитаний, в т.ч. из многолетнемерзлых отложений. Напротив, быстро и массово прорастающие споры *S. echinulata* имеют наиболее слабые позиции по сравнению с медленнорастущими штаммами. Споры многих представителей этого вида не способны сохранить жизнеспособность при сублимационной сушке, а период гарантированного хранения спор в почве также меньше, чем у других изученных в данной работе культур. Полученные данные показывают, что вопрос о функциональном значении трегалозы в процессе выхода спор из состояния покоя еще далек от разрешения и требует дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-04-03484).

1. Barton J.K., Den Hollander J.A., Hopfield J.J., Shulman R.G.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance study of trehalose mobilization in yeast spores // J. Bacteriol. 1982. V. 151. P. 177–185.
2. Мысякина И.С., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Прорастание спор мицелиальных грибов в связи с экзогенным покоем // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 269–274.
3. Мысякина И.С., Усов А.И., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Содержание трегалозы в покоящихся и прорастающих спорах мицелиальных грибов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3 (1). С. 91–93.
4. Wyatt T.T., Wösten H.A.B., Dijksterhuis J. Fungal spores for dispersion in space and time // Adv. Appl. Microbiol. 2013. V. 85. P. 43–91.

# РАЗНООБРАЗИЕ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЕРИФЕРИЙНОГО МЕТАБОЛИЗМА, ИНДУЦИРУЮЩИХСЯ У АКТИНОБАКТЕРИЙ *RHODOCOCCUS OPACUS* 1CP И *RHODOCOCCUS WRATISLAVIENSIS* G10 ПРИ РОСТЕ НА БЕНЗОАТЕ НАТРИЯ

**О. В. Борзова<sup>1,2</sup>, И. П. Соляникова<sup>2</sup>, Е. С. Шумкова<sup>2,3</sup>, Е. В. Емельянова<sup>2</sup>, Н. В. Присяжная<sup>2</sup>, Д. О. Егорова<sup>4</sup>, Е. С. Корсакова<sup>4</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>4</sup>, Л. А. Головлева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

<sup>2</sup> ФАНО ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино

<sup>3</sup> ФАНО ФГБУН Институт биохимии, Москва

<sup>4</sup> ФАНО ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь

Бензоат, как и многие производные бензойной кислоты, широко используется в промышленности в качестве консерванта (Gibson, 1971 и Smith, 1990). Соли бензойной кислоты попадают в окружающую среду при процедуре сброса с очистных сооружений, что может приводить к их нежелательному накоплению. При анаэробном и аэробном разложении различных ароматических соединений, таких как толуол, ксилол, карбазол и бифенил, бензоат является центральным интермедиатом (Kim, Harwood, 1991).

Способность бактерий разлагать ароматические соединения опосредуется наличием у них высокоспецифичных ферментов. Для полной утилизации ростовых субстратов бактериям требуется присутствие специфичных ферментов начальной атаки, которые позволяют клетке осуществить первоначальное воздействие на субстрат, и набор ферментов, катализирующих превращение образующихся продуктов до интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Это в целом обеспечивает метаболическое разнообразие микроорганизмов и дает им возможность использовать различные ростовые субстраты (Pieper, 2005; Pieper et al., 2010).

Цель работы была сравнительная характеристика способности актинобактерий разлагать бензоат: определение субстратной специфичности бензоат 1,2-диоксигеназы (БДО) у культур при росте на бензоате, характеристика индуцирующегося ферментного комплекса (моно- и диоксигеназы), определение генов биodeградации бензоата у изучаемых культур.

В ходе работы было установлено, что у выделенных из территориально-удаленных сайтов штаммов *Rhodococcus opacus* 1CP, *Rhodococcus opacus* 6a, *Rhodococcus ruber* P25, *Rhodococcus wratislaviensis* P1 и *Rhodococcus wratislaviensis* G10 гены, кодирующие  $\alpha$ -субъединицу БДО имеют сходство, составляющее от 88 до 97% с БДО штамма

*Rhodococcus jostii* RHA1, что указывает на общее происхождение этих генов. Определение активности ферментов периферийного метаболизма, индуцирующихся при росте на бензоате, позволило зафиксировать одновременную индукцию пирокатехин-1,2-диоксигеназы (ПК-1,2-ДО), протокатехоат-3,4-диоксигеназы (ПКК-3,4-ДО) и гентизат диоксигеназы (Соляникова, 2015).

На основании обнаруженных особенностей для дальнейших исследований нами были выбраны 2 штамма: *R. opacus* 1СР – высокоактивный деструктор хлорфенолов, и *R. wratislaviensis* G10 – деструктор хлорбифенилов. Анализ активности БДО *R. opacus* 1СР с изомерными хлор-, гидрокси- и метилзамещенными бензоатами не позволил выявить соединения, активность БДО с которыми была бы сравнима с активностью с бензоатом. Только некоторые субстратные аналоги (3- и 4-хлорбензоаты) выступали в качестве ингибиторов реакции БДО с бензоатом. Активность БДО *R. wratislaviensis* G10 с 13 из 35 субстратных аналогов была выше 10% от уровня активности с бензоатом. Таким образом, БДО *R. wratislaviensis* G10 обладала преимуществом, выразившимся в меньшей субстратной специфичности по сравнению с аналогичным ферментом штамма *R. opacus* 1СР, который характеризовался очень узкой субстратной специфичностью. Можно предположить, что, хотя активность БДО штамма *R. wratislaviensis* G10 с субстратами, отличными от бензоата, и остается на невысоком уровне, но в неблагоприятных условиях это позволяет культуре осуществлять атаку на новые субстраты, что в целом повышает возможности данного штамма к выживанию в неблагоприятных условиях.

Из биомассы штаммов *R. opacus* 1СР и *R. wratislaviensis* G10, выращенных на бензоате, были выделены и охарактеризованы протокатехоат-3,4-диоксигеназа и пирокатехин-1,2-диоксигеназа. Сравнимые диоксигеназы были относительно схожи по своим физико-химическим характеристикам (табл. 1). Для ПКК-3,4-ДО штамма *R. wratislaviensis* G10 было обнаружено ингибирование активности пирокатехином. Но при этом, пирокатехин не ингибировал реакцию ПКК-3,4-ДО штамма *R. opacus* 1СР с протокатехоатом (ПКК). ПКК не являлся ингибитором активности ПК-1,2-ДО штамма *R. wratislaviensis* G10 с пирокатехином. Слабая активация реакции ПК-1,2-ДО с пирокатехином в присутствии ПКК, обнаруженная у штамма *R. opacus* 1СР, не наблюдалась у ПК-1,2-ДО штамма *R. wratislaviensis* G10. Полученные результаты говорят о том, что у штамма *R. opacus* 1СР одновременное присутствие двух диоксигеназ не является проблематичным с точки зрения эффективности ферментного катализа. У штамма *R. wratislaviensis* G10 пирокатехин ингибирует реакцию ПКК-3,4-ДО с протокатехоатом. При этом следует учитывать, что активность обеих диоксигеназ в



бесклеточном экстракте сильно варьирует в зависимости от концентрации ростового субстрата.

Методом времяпролетной матрица-активированной лазерной десорбции-ионизации показана высокая степень идентичности белковых профилей клеток *R. opacus* 1СР и *R. wratislaviensis* G10, выращенных на бензоате и богатой среде. На ДНК штамма *R. wratislaviensis* G10 с использованием специфичных праймеров к вариабельным участкам генов, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы протокатехоат-3,4-диоксигеназы штамма *R. opacus* 1СР, проходила специфичная амплификация. Сходство 500-нуклеотидных участков обеих субъединиц протокатехоат-3,4-диоксигеназы *R. opacus* 1СР и *R. wratislaviensis* G10 составило 99%. С использованием праймеров, специфичных к генам пирокатехин-1,2-диоксигеназ штамма *R. opacus* 1СР, у штамма *R. wratislaviensis* G10 обнаружено два гена, кодирующих пирокатехин-1,2-диоксигеназы. Таким образом, показанное ранее (Соляникова, 2015) и обнаруженное в ходе выполнения данной работы очень высокое сходство генов (до 99%) биодеструкции ароматических соединений у штаммов *R. opacus* 1СР и *R. wratislaviensis* G10, выделенных с разницей в 20 лет из образцов почв, расположенных на расстоянии 1400 км друг от друга, свидетельствует об общем происхождении этих генов.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-14-00368.

Список литературы:

1. Gibson, D. T. The microbial oxidation of aromatic compounds / D. T. Gibson // Crit. Rev. Microbiol. – 1971. – № 1. – P. 199–223.
2. Kim, M.-K. Regulation of benzoate-CoA ligase in *Rhodopseudomonas palustri* / M.-K. Kim, C. S. Harwood // FEMS Microbiol. Let. – 1991. – № 83. – P. 199–203.
3. Smith, M. R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria / M. R. Smith // Biodegradation. – 1990. – № 1. – P. 191–206.
4. Solyanikova, I. P. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria. / I. P. Solyanikova, E. V. Emelyanova, E. S. Shumkova, D. O. Egorova, E. S. Korsakova, E. G. Plotnikova, L. A. Golovleva // Int. Biodet. Biodegr. – 2015. – № 100. – P. 155–164.

# НОВЫЙ ШТАММ АНАММОКС-БАКТЕРИИ *CANDIDATUS* 'JETTENIA ASIATICA', ОТСЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫЙ В ХОДЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРОТОЧНЫХ УСЛОВИЯХ, И АКТИВНЫЙ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТОВ И pH.

**Бочкова Е. А., Литги Ю.В., Ножевникова А.Н.**

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Анаммокс-бактерии – анаэробные хемолитоавтотрофные микроорганизмы, осуществляющие процесс анаэробного окисления аммония нитритом с образованием молекулярного азота. Ни один из видов анаммокс-бактерий до сих пор не выделен в чистую культуру, все они имеют статус кандидатов на принадлежность к новым видам – *Candidatus*. Анаммокс-бактерии характеризуются крайне низкой скоростью роста, составляющей, в среднем, 11 суток. По этой причине традиционные микробиологические методы непригодны для культивирования анаммокс-бактерий — необходимо использовать специальные методы проточного культивирования в биореакторах. В настоящее время анаммокс-бактерии широко используются в биотехнологии биологической очистки сточных вод, богатых азотсодержащими и бедных органическими загрязняющими веществами. Для повышения эффективности существующих и создания новых систем очистки стоков различного происхождения и состава важное значение имеет поиск новых видов и штаммов анаммокс-бактерий, которые эффективно осуществляли бы процесс анаммокс в меняющихся условиях среды: при разных значениях pH, температуры, концентрации азотсодержащих веществ.

Микробное сообщество, ставшее объектом исследования в этой работе, было накоплено в течение длительного (более 5 лет) культивирования активного ила из денитрификатора станции очистки сточных вод в долине реки Мзымта (Сочи). Культивирование осуществляли в проточных условиях в лабораторном анаэробном вертикальном биореакторе с восходящим потоком среды и иммобилизацией микроорганизмов на полимерных носителях-ершах, на минеральной среде в условиях повышающейся нагрузки по азотным субстратам - аммонии и нитриту. Подача среды в реактор происходит снизу вверх, что обуславливает стратификацию условий по высоте реактора. Целью работы было получение в условиях проточного биореактора микробного сообщества анаммокс-бактерий, стабильно функционирующего в течение длительного

времени в стратифицированных условиях среды при повышающейся нагрузке по азотным и углеродному субстратам и эффективно удаляющего их из среды, а также мониторинг динамики состава сообщества и описание ведущего вида/штамма анаммокс-бактерий.

Сообщество биореактора с эффективностью удаления до 98% использует азотные субстраты, в том числе и в высоких концентрациях. К настоящему времени нагрузка по азотным субстратам составила 4,2 г N/л сут и является почти предельной для лабораторных анаммокс-реакторов. В нижней части реактора, куда подаётся свежая среда, концентрация субстратов в 2 раза выше, а значение pH ниже почти на единицу, чем в верхней части реактора. Стратификация условий по высоте реактора создаёт возможность для существования в верхней и нижней частях реактора разных видов анаммокс-бактерий. Однако, уже в первые 1,5-2 года работы реактора наблюдалось развитие *Candidatus* 'Jettenia asiatica' во всех части реактора. Кроме этого вида, в нижней части реактора также присутствовали 2 вида анаммокс-бактерий рода *Candidatus* 'Brocadia'. К пятому году с момента начала культивирования бактерия вида *Candidatus* 'Jettenia asiatica' обильно развилась по всей высоте реактора и стала доминирующим видом бактерий в исследуемом сообществе, содержащем также спутники, представленные бактериями филумов Chloroflexi, Proteobacteria, Chlorobi и другими.

Методом секвенирования гена 16S рРНК показано, что вид *Candidatus* 'Jettenia asiatica', представлен новым штаммом, на 2% отличающимся от видового штамма (номер в базе данных GENBANK [DQ301513.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/DQ301513.1)). Новый штамм *Candidatus* 'Jettenia asiatica' *ecosi* обладает способностью расти в широком интервале концентрации субстрата, от 0,02 до 2,6 г N/л, и pH от 7,2 до 8,8. Оптимальная температура роста составляет 30°C. Скорость роста составляет 12 суток. С помощью метода хромато-масс-спектрометрии показано присутствие в мембранах клеток анаммокс-бактерий биореактора гопаноидов и уникальных ладдеральных липидов, не встречающихся ни у каких иных организмов, кроме анаммокс-бактерий и являющихся одним из надёжных маркеров для детектирования этой группы микроорганизмов.

По данным световой и электронной микроскопии анаммокс-бактерии биореактора имеют клетки диаметром около 1 мкм коккоидной морфологии, с типичной для анаммокс-бактерий ультраструктурой: наличие трёх клеточных компартментов, отделённых друг от друга мембранами. Клетки имеют тенденцию к формированию микроколоний, окружённых толстым слоем внеклеточного полимерного матрикса. Отдельные микроколонии анаммокс-бактерий, вместе с клетками микроорганизмов-спутников, образуют в условиях биореактора биоплёнки двух типов: объёмные гранулы диаметром

до 17 мм на волокнах носителей-ершей и в осадке и тонкослойные биоплёнки на стенках реактора толщиной до 1 мм.

Активные биоплёнки-гранулы анаммокс-бактерий были успешно использованы в качестве посевного материала для запуска нового лабораторного анаммокс-реактора, являющегося частью системы из 2-х сопряжённых вертикальных реакторов: в первом осуществляется процесс частичной нитрификации, а во втором — анаммокс. В качестве посевного материала для реактора частичной нитрификации использован активный ил из аэротенка Курьяновских очистных сооружений. После инкубационного периода, составившего приблизительно 180 суток, система вышла на стабильный режим работы (эффективность удаления 85%) на минеральной среде. В настоящее время система тестируется для очистки иловой воды, получаемой после обезвоживания сброженной модельной органической фракции ТБО (комбикорма). К настоящему моменту в установки удаляется из исходной иловой воды до 65% азота.

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ УЛУЧШЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ.**

**Булахов А.Г., Волков П.В., Гусаков А.В., Рожкова А.М.**

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской академии наук, 119071 Российская Федерация, г.  
Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

Целлюлозосодержащая растительная биомасса является крупнотоннажным восполняемым отходом деревообрабатывающей промышленности и агропромышленного комплекса. Продукты переработки биомассы являются важными продуктами для различных отраслей промышленности. Современные технологии деструкции целлюлозосодержащего сырья основаны на ферментативном гидролизе предобработанного материала.

Целлюлолитические ферментные препараты, разрабатываемые в нашей лаборатории, основаны на гидролитическом комплексе секрета штамма *Penicillium verruculosum*. Однако недавно было обнаружено, что помимо гидролаз существенную

роль в разложении биомассы играют ферменты, осуществляющие окислительную деструкцию целлюлозы, полисахаридмонооксигеназы.

Полисахаридмонооксигеназам (ПМО) требуется наличие в реакционной смеси кислорода и донора электронов. Им могут выступать фермент целлобиозодегидрогеназа, химические агенты, а также ароматические продукты деструкции лигнина, содержащиеся в древесных субстратах.

Многочисленно было выделено и очищено 3 полисахаридмонооксигеназы, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* и *Myceliophthora thermophila*. Было показано, что их добавка совместно с донором электронов позволяет увеличивать эффективность гидролитического комплекса на основе *P. verruculosum* вплоть до 35%. Так же наиболее эффективная ПМО *Tr. reesei*, была клонирована в штамм на основе *P. verruculosum* под глюкоамилазным промотором. Вставка генов под данным промотором и их экспрессия не нарушает целостности гидролитического комплекса гриба. Новый ферментный препарат, содержащий ПМО *Tr. reesei* оказался на 30% эффективнее контрольного при гидролизе осиновой древесины.

Таким образом, внедрение ПМО в целлюлолитические комплексы на основе карбогидраз позволяет существенно увеличить их эффективность и повысить рентабельность процесса ферментативной конверсии древесной биомассы.

## **НОВАЯ АНОКСИГЕННАЯ НИТЧАТАЯ ФОТОТРОФНАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННОГО ОЗЕРА КИРАН**

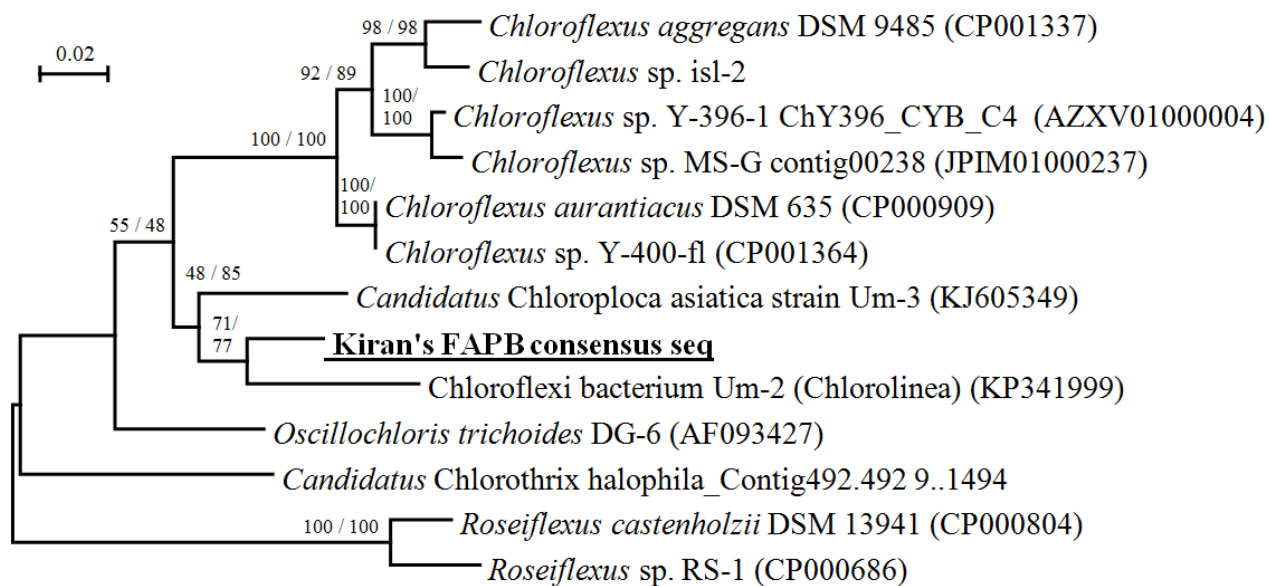
**Бурганская Е.И., Гайсин В.А., Брянцева И.А.**

Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Фототрофные организмы являются ключевыми компонентами природных экосистем. Во многих случаях в экстремальных экосистемах доминирующими фототрофами являются прокариоты, главным образом цианобактерии и аноксигенные фототрофные бактерии. Среди последних научный интерес представляют аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ), которые представляют значительную долю сообщества микробных матов. На сегодня достаточно много работ, посвященных описанию микробных матов из высокоминерализованных экосистем, в том числе минерализованных озер. Однако работы по изучению культур АНФБ из минерализованных озер немногочисленны. Перспективными объектами для изучения разнообразия АНФБ и выделения новых штаммов являются высокоминерализованные

озера Восточной Сибири. Так, ранее из экосистем этого региона нами была выделена новая бактерия «*Candidatus Chloroloca asiatica*» (Gorlenko et al. 2014).

В данной работе нами было проведено исследование новой АНФБ – изолята Kir15-3F, выделенного из карбонатно-натриево-сульфатного озера Киран с общей минерализацией около 35 г/л (озеро Солёное, республика Бурятия). Для получения накопительной культуры Kir15-3F нами была использована среда, содержащая 12 г/л NaCl и 0.7 г/л Na<sub>2</sub>S. Изолят Kir15-3F рос в анаэробных условиях на свету, образуя колонии зеленого цвета в нижней части столбика агаризованной среды. Клетки Kir15-3F собраны в трихомы диаметром 1.2-1.3 мкм, что близко к диаметру клеток *Oscillochloris trichoides*, в то же время диаметр клеток «*Candidatus Chloroloca asiatica*» составляет 0.5-0.7 мкм. Наблюдается скользящий тип движения. На ультратонких срезах были выявлены крупные палочковидные вакуоли, собранные в группы возле межклеточной перегородки. Вакуоли также наблюдаются в световой микроскоп и в живых клетках локализованы возле межклеточной перегородки. Также на ультратонких срезах выявлены хлоросомы, расположенные вдоль всей внутренней поверхности мембраны. Чехол не обнаружен. Анализ пигментного состава клеток выявил наличие значительного количества бактериохлорофилла *c* (максимум поглощения 754 нм). Полный спектр включал максимумы поглощения на 460, 754 нм и минорные пики на 640, 680 нм, а также плечи на 440, 500 и 860 нм. Хотя максимумы, характерные для бактериохлорофилла *a* не были выявлены, с помощью высокопроизводительной жидкостной хроматографии было определено наличие малого количества этого пигмента. Кроме того было показано наличие ликопина. С использованием праймеров, специфичных для бактерий семейства *Oscillochloridaceae*, не удалось выявить наличие гена *cbbL*. Аналогичный результат был получен для бактерии «*Candidatus Chloroploca asiatica*». Была получена полная последовательность гена 16S рРНК изолята Kir15-3F. Результаты филогенетического анализа по гену 16S рРНК выявили, что филотип изолята Kir15-3F образует общую кладу вместе с «*Candidatus Chloroploca asiatica*». Однако уровень сходства с «*Candidatus Chloroploca asiatica*» составлял 93%, что соответствует уровню отдельного рода. По совокупности результатов филогенетического анализа и сравнения морфологических признаков, можно предположить, что изолят Kir15-3F является кандидатом на новый таксон в ранге рода внутри подпорядка *Chloroflexineae*.



Maximum Likelihood / Neighbor-Joining

Рис. 1 Филогенетическое положение Kir15-3F. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей гена 16S с использованием алгоритмов Maximum Likelihood и Neighbor-Joining. Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 1000 альтернативных дендрограмм. Длина сравниваемых последовательностей составляла 1398 аминокислот.

**Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-07655**

## УСТОЙЧИВОСТЬ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *DESULFOVIBRIO* К АКТИВНЫМ ФОРМАМ КИСЛОРОДА И ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

**Е. Г. Воробьева<sup>1</sup>, А. Л. Брюханов<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, Россия

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) являются широко распространенными в природе строго анаэробными микроорганизмами, но многие виды (например, представители рода *Desulfovibrio*) способны сохранять жизнеспособность и даже метаболическую активность в микроаэробных условиях. В клетках большинства СРБ для инактивации активных форм кислорода присутствуют как классические

(супероксиддисмутаза, каталаза), так и уникальные альтернативные (супероксидредуктазы, негемовые НАДН-зависимые пероксидазы) ферменты [1].

В нашей работе была изучена возможность роста *Desulfovibrio* sp. штамм А2, выделенного из окисленных осадков отстойника Челябинского цинкового завода [2], в условиях окислительных стрессов различной природы и интенсивности. Показано, что *Desulfovibrio* sp. штамм А2 обладает значительной аэротолерантностью – лишь 10%-ная начальная концентрация  $O_2$  в газовой фазе значительно удлиняла фазу экспоненциального роста культур и резко, более чем в 3 раза, снижала выход биомассы. Штамм А2 был способен расти даже после внесения 0,5 мМ  $H_2O_2$  в жидкую лактат-сульфатную питательную среду, хотя и с почти двукратным снижением выхода биомассы; сильное бактериостатическое воздействие на рост культур штамма А2 оказывал только 1 мМ пероксид водорода.

Соответствующие концентрации окислителей, оказывающие на клетки *Desulfovibrio* sp. штамм А2 ингибирующее, но нелетальное воздействие, были выбраны для изучения активностей ключевых ферментов антиокислительной защиты в условиях различных окислительных стрессов [3]. Обнаружено, что клетки штамма А2 в анаэробных условиях обладают активностями СОД, каталазы и пероксидазы. Показано, что 45-мин и 120-мин экспозиция с  $H_2O_2$  (начальная концентрация в среде – 0,15 мМ) увеличивала каталазную активность в экстрактах клеток штамма А2 более чем в 9 и 22 раза, соответственно. С другой стороны, сильные окислительные стрессы (1 мМ  $H_2O_2$  и 10%  $O_2$ , экспозиция 45 и 120 мин) приводили к значительному снижению каталазной активности в экстрактах клеток штамма А2. Пероксидазная активность у штамма А2 в условиях различных окислительных стрессов изменялась незначительно. Активность СОД в экстрактах клеток штамма А2 при продолжительном воздействии высоких концентраций окислителей значительно снижалась, что обусловлено, вероятно, инактивацией Fe-содержащих белков в клетках СРБ при сильных окислительных стрессах для уменьшения высвобождения катионов железа из деградируемых белковых молекул и уменьшения, таким образом, вероятности протекания реакции Фентона.

Многие представители сульфатредуцирующих бактерий обладают способностью к восстановлению хорошо растворимых в воде токсичных солей тяжелых металлов и металлоидов до плохо растворимых и менее токсичных соединений при помощи металл-редуктаз. Так как в последнее время загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и металлоидами в результате антропогенного воздействия значительно возросли, то одной из приоритетных задач микробной биотехнологии является развитие методов биоремедиации экосистем от этих опасных соединений. Поскольку исследуемый



штамм А2 был выделен из осадков отстойника предприятия цветной металлургии, то нами было сделано предположение, что он обладает устойчивостью к высоким концентрациям тяжелых металлов, в частности, к солям Cr(VI).

Для проверки устойчивости штамма А2 к высоким концентрациям солей Cr(VI) в жидкую питательную среду вносили  $K_2CrO_4$  или  $(NH_4)_2CrO_4$  и изучали динамику роста культур по образованию сероводорода. Рост снижался с увеличением начальной концентрации Cr(VI) в питательной среде, причем хромат аммония сильнее ингибировал развитие культур, чем хромат калия в тех же концентрациях. Тем не менее, *Desulfovibrio* sp. штамм А2 оказался весьма устойчивым к солям хрома(VI). С целью изучения возможности удаления хроматов клетками штамма А2 из буферного раствора с лактатом в качестве донора электронов был проведен опыт с суспензиями отмытых клеток. Показано, что концентрация хроматов в буферном растворе снижалась со 100-500 мкМ до околонулевых значений в течение 30-60 мин с момента засева суспензией клеток, причем хромат аммония восстанавливался клетками быстрее.

Таким образом, нами было показано, что *Desulfovibrio* sp. штамм А2 обладает достаточно высокой устойчивостью к активным формам кислорода и солям хрома(VI), обладая ферментативными системами антиокислительной защиты и, по всей видимости, металл-редуктазными системами. Полученные результаты дают также основания полагать, что *Desulfovibrio* sp. штамм А2 может обладать хорошим потенциалом для использования в биоремедиации сточных вод и промышленных осадков от токсичных солей хрома(VI).

Работа частично финансировалась из проекта “Получение штаммов-продуцентов сульфидов металлов из окисленных осадочных отложений хвостохранилищ добычи полиметаллических руд с использованием микробиологических, биохимических и геномных технологий” (соглашение Минобрнауки РФ №14.604.21.0108 от 07.08.2014 г., RFMEFI60414X0108) в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”.

[1]. Brioukhanov A., Pieulle L., Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Ed. Mendez-Vilas A. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. V. 1. P. 148-159.

[2]. Karnachuk O.V., Sasaki K., Gerasimchuk A.L., Sukhanova O., Ivasenko D.A., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., Tuovinen O.H. Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates. Geomicrob. J. 2008. V. 25. P. 219-227.

[3]. Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Динариева Т.Ю., Карначук О.В., Нетрусов А.И., Пименов Н.В. Компоненты антиокислительных систем в клетках аэротолерантных сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio* (штаммы А2 и TomC), выделенных из отходов добычи металлов. Микробиология. 2016. Т. 85(6). В печати.

DOI: 10.7868/S0026365616060045

## **НОВЫЕ МЕЗОФИЛЬНЫЕ АНОКСИГЕННЫЕ НИТЧАТЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ**

**В.А. Гайсин, И.А. Брянцева, А.М. Калашников, Д.С. Груздев, Е.И. Бурганская, М.В. Сухачева, Е.А. Волынчикова, Б.Б. Кузнецов и В.М. Горленко**

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Первый штамм аноксигенных нитчатых фототрофных бактерии (АНФБ) был открыт в 1971 году, а в 1974 году этот штамм был описан как термофильная бактерия *Chloroflexus aurantiacus* (Pierson, Castenholz, 1974). В тоже время была описана первая мезофильная АНФБ (Горленко, 1975). Однако дальнейшую историю изучения АНФБ можно назвать историей изучения термофильных АНФБ, т. к. большинство работ по исследованию особенностей биологии АНФБ сделано на термофильных штаммах. Единственной подробно изученной в культуре АНФБ является *Oscillochloris trichoides* DG-6. Также большинство экологических работ сделано на основании исследования матов из термальных экосистем. Таким образом в исследовании АНФБ относительно крупны пробел, обусловленная скудными данными о функциональном и филогенетическом разнообразии мезофильных АНФБ. Не смотря на раннее открытие мезофильных АНФБ данная научная проблема остается актуально на сегодня.

В представляемом докладе обобщены результаты исследования разнообразия мезофильных АНФБ полученные за последние 5 лет совместной работы лаборатории экологии и геохимической деятельности и лаборатории молекулярной диагностики. В ходе выполнения исследования были изучены образцы из мезофильной зоны термальных источников Бурятии, теплый источник из Северной Осетии, минерализованные озера Восточной Сибири и ванн супралиторали Белого моря.

На основании результатов исследования источников Бурятии, можно предположить, что «теплая» зона (35 — 44°C) щелочных термальных источников является транзитной областью, в которой соприкасаются термофильные и мезофильные АНФБ. В теплой ванне источника Умхей (температура в разных точках колеблется возле отметки 40°C) были

обнаружены термофильные АНФБ родов *Roseiflexus* и *Chloroflexus*. В тоже время из этой ванны были выделены новые мезофильные АНФБ «*Candidatus Chloroploca asiatica*» и изолят «*Chlorolinea*». «*Candidatus Chloroploca asiatica*» и «*Chlorolinea*» были также детектированы в источнике Кучигер в точке с температурой 35°C. Филотип относящийся к кладе филотипа «*Chlorolinea*» был обнаружен в Верхнекармадонском теплом источнике (33°C). Хотя вопрос принадлежности Верхнекармадонского филотипа, к той или иной группе АНФБ остается открытым.

Нами были описаны культуры новой мезофильной ФНФБ «*Candidatus Chloroploca asiatica*» выделенные из слабоминерализованных содовых озер и из микробного мата источника Умхей. Озерные изоляты и монокульту выделенные из источника имеют небольшую разницу в последовательностях гена 16S рРНК, однако являются одним видом. В 2015 году нами была выделена новая бактерия (далее изолят Kir15-3) из минерализованного озера Киран (Бурятия). Филогенетический анализ показал, что изолят Kir15-3 является кандидатом на новый таксон в ранге рода. В тоже время изолят Kir15-3 формирует общую кладу с «*Candidatus Chloroploca asiatica*», что может указывать на озерное распространение бактерий клады. Однако в 2015 году были получены новые монокультуры «*Candidatus Chloroploca asiatica*» из мезофильной зоны термальных источников. Данные результаты поднимают вопрос о первичной экологической ниши для бактерий этой клады.

Накопление данных о новых мезофильных АНФБ затрагивают вопрос таксономической ревизии всей внутри группы фототрофных *Chloroflexi*. Требуют уточнение таксономического положения бактерии «*Candidatus Chloroploca asiatica*» и изолята Kir15-3. Полученная нами последовательность геномной ДНК бактерии «*Candidatus Chloroploca asiatica*» дала возможность исследовать филогенетические связи внутри группы мезофильных хлоросом-содержащих АНФБ. Характер распространения изолятов мезофильных АНФБ поднимает вопрос об их экологической роли.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-07655

## АЦИДОТОЛЕРАНТНЫЙ ГРИБ РОДА *PENICILLIUM*, УСТОЙЧИВЫЙ К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Глухова Л.Б.<sup>1</sup>, Груздев Е.В.<sup>2</sup>, Белецкий А.В.<sup>2</sup>, Стрелкова Е.В.<sup>1</sup>, Карначук О.В.<sup>1</sup>,  
Равин Н.В.<sup>2</sup>, Марданов А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск.

<sup>2</sup> Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Экстремальные местообитания и их микробиологические сообщества потенциально являются источником новых генов, придающих устойчивость к высоким концентрациям металлов, металлоидов и экстремальным рН. Кислые шахтные дренажи (КШД) характеризуются низкими значениями рН и высокими концентрациями растворенных элементов, что делает их высокоселективными местообитаниями. Эукариотические организмы, в частности микроскопические грибы, являются неотъемлемой частью микробиоты таких местообитаний. Наиболее часто встречаются представители отделов *Basidiomycota* и *Ascomycota*. Такое разнообразие обусловлено несколькими стратегиями выживания грибов в неблагоприятных условиях: (1) регуляция экспрессии транспортеров, ответственных за приток или отток металлов из клетки; (2) изоляция или компартиментализация металлов внутри или вне клетки; (3) повышение уровня глутатиона; (4) экспрессия фитохелатинов и металлотионеинов и (5) изменение проницаемости мембран. Эти стратегии зависят от вида организма, типа элемента и варьируют среди грибов. В связи с этим функциональная роль грибов в микробных сообществах КШД представляет фундаментальный интерес.

Из воды и осадков бывшего хвостохранилища месторождения Шерловая гора (Забайкальский край), с физико-химическими показателями рН 1.95, Т 9.5 °С, Eh +689 мВ и высоким содержанием железа (18.3 г/л), меди (2.08 г/л), цинка (2.76 г/л) и мышьяка (2.91 г/л), был выделен гриб, изолят ShG4C. Исследование физиологических свойств изолята показало, что он кислотолерантен, в условиях культивирования *in vitro* проявил высокую устойчивость к  $As^{5+}$  (до 9 г/л),  $Cu^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  (до 10 г/л).

Митохондрии играют важную роль в процессах дыхания и преобразования энергии в эукариотических клетках. У грибов металлы в разных концентрациях влияют на дыхательную цепь, запуская, в некоторых случаях, альтернативные пути дыхания.

Мы просеквенировали и проанализировали полный митохондриальный геном штамма ShG4C. МтДНК представлял собой кольцевую молекулу ДНК длиной 26725 нт. и содержит стандартный набор генов, который включает 15 белок-кодирующих генов, 27

генов тРНК и 2 гена рРНК. Все обнаруженные гены кодировались на одной цепи мтДНК. 14 митохондриальных белок-кодирующих генов имели ATG старт-кодона, за исключением гена *Cox1* (старт-кодон - TTG). Ген *Nad6* имел TAG стоп-кодон, в то время как у других стоп-кодоном являлся TAA. Содержание GC пар в митохондриальном геноме *Penicillium ShG4C* составило 25 % как и в других геномах рода *Penicillium* (например, *Penicillium polonicum* - 25.56% , NC\_030172). Для определения таксономического положения нового штамма был проведен филогенетический анализ с использованием конкатенантанных последовательностей 14 митохондриальных белков, который показал, что изолят ShG4C относится к роду *Penicillium*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-50164 и грантом президента РФ МД-7668.2016.4.

## **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАГЕНОМНОГО ПОДХОДА И ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА МИКРОБИОМА ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО В РОССИИ**

**М.А. Горбачева**

Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Россия входит в число стран наиболее обеспеченных земельными ресурсами, но грубое нарушение технологий интенсивного земледелия приводит к их масштабной деградации. В связи с этим необходимо изучение таксономического состава различных типов почв с помощью глубокого секвенирования. В данной работе впервые проанализирован состав и функциональные особенности двух микробиомов чернозема типичного (целина и пашня) с помощью высокопроизводительного глубокого секвенирования на платформе Illumina и дальнейшего метагеномного анализа полученных чтений с помощью геномных клад-специфичных маркеров.

На сегодняшний день изучено менее 1% бактерий (Amann, 1995). Подход с использованием 16S-специфичных праймеров подтвердил свою эффективность при анализе масштабных микробных сообществ, но использование консервативных геномных клад-специфичных маркеров (Kmer) делает такого рода исследования еще более объективными (Segata et al., Nature Methods, 2012).

Важно отметить, что для анализа было отобрано по две реплики каждой почвы (пашня и целина) из слоя (0-10 см) горизонта А (Курская область, Россия). Чтобы

получить полное представление о микробных сообществах чернозема типичного на видовом уровне, применен метод shotgun секвенирования. Образцы почв также были использованы для определения их функциональных потенциалов с использованием ферментативных и метаболических маркеров (CAZymes, KEGG и др.).

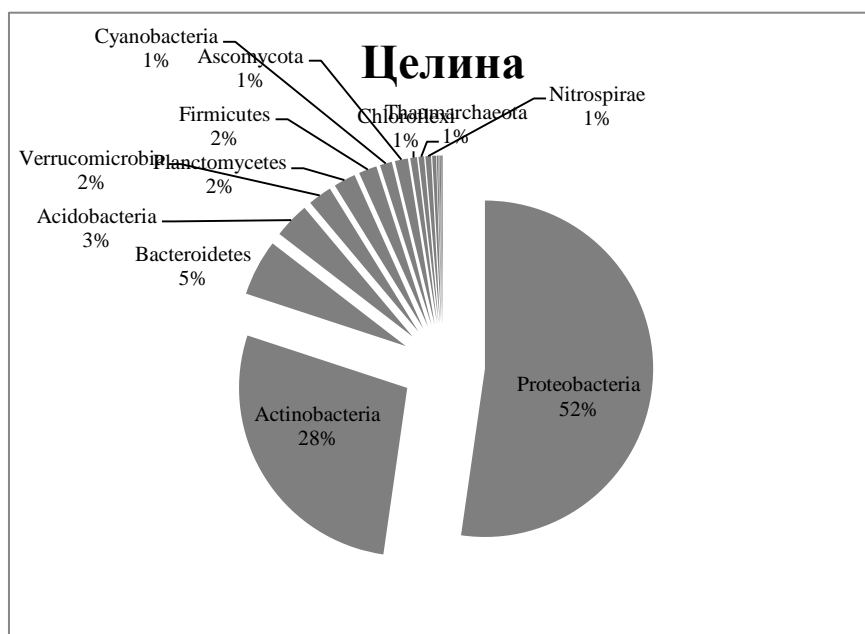
Метагеномный анализ данных проводился мировым лидером в области услуг NGS - Novogen. Выравнивание полученных последовательностей проводилось с помощью сервиса DIMOND. Систематическую аннотацию для каждой операции чтения проводили с использованием алгоритма наименьшего общего предка. Численность отдельного вида на каждом таксономическом уровне рассчитывалась как сумма всех чтений, аннотированных к виду.

Были определены преимущественные филумы для каждой из двух реплик целины и пашни (рис.1). Из которых в целине по сравнению с пашней доминировали следующие филумы: *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus* и *Nitrospirae*. Отмечено присутствие аборигенных почвенных филумов *Proteobacteria* (52-58%) и *Actinobacteria* (25-28%) в составе последнего доминировал азотфиксатор *Bradyrhizobium elkanii*. Представители филума *Actinobacteria* известны как производители вторичных метаболитов, были также представительнее в целине (28%), они порождают фармакологический интерес. Они также участвуют в круговороте органических веществ и в углеродном цикле. Обнаружены представители нового филума *Verrucomicrobia* (пашня 3% - целина 2%). Известны факты снижения метаболически активных клеток веррукомикробий в пашне по сравнению с целиной, из-за агрогенной нагрузки на почву. Значимость цианобактерий (*Cyanobacteria*) в целине и пашне была одинакова (1%).

Помимо бактерий, в репликах целины чернозема типичного высокую долю значимости имели также археи. Представители филума *Thaumarchaeota* в гумусовом горизонте достигли 1% и *Euryarchaeota* (пашня 0,5% - целина 1 %). *Thaumarchaeota* наиболее распространенные почвенные археи. Отмечено, что они играют ведущую роль в процессе нитрификации. Степень доминирования таумархеот в почве коррелирует с содержанием органического углерода и азота (Bates et al., 2011). Принадлежность *Thaumarchaeota* к верхнему гумусовому горизонту соответствует этой зависимости и может быть свидетельством их участия в трансформации органического вещества почвы. Известны факты метаногенеза внутри агрегатов черноземов, поэтому в пашне эвриархеоты менее значимы, чем в целине (Манучарова, Степанов, 2001). *Crenarchaeota*

это еще один из основных филумов домена Archaea, которые были представительнее в целине, по-видимому ризосфера является менее благоприятной средой для кренархеот (Ochsenreiter et al., 2003).

Кроме этого отмечен высокий процент представленности филума *Firmicutes* (пашня 1% - целина 2%) в составе бактерий. Фирмикуты широко распространены в верхних горизонтах черноземов. Бактерии-дiazотрофы, относящиеся к филуму *Nitrospirae* были представительнее в целине (1%), они обладают потенциальной способностью к фиксации азота из воздуха. В пашне также были представительны филумы: *Aminicenantes*, *Ignavibacteriae*, *Synergistetes* (менее 1%), которые относятся к некультивируемым ранее. Также в пашне отмечен филум *Fusobacteria*, представители которого патогенны. Таким образом, были получены новые геномные данные по двух репликам чернозема типичного в России с помощью применения глубокого секвенирования и клад-специфичных маркеров.



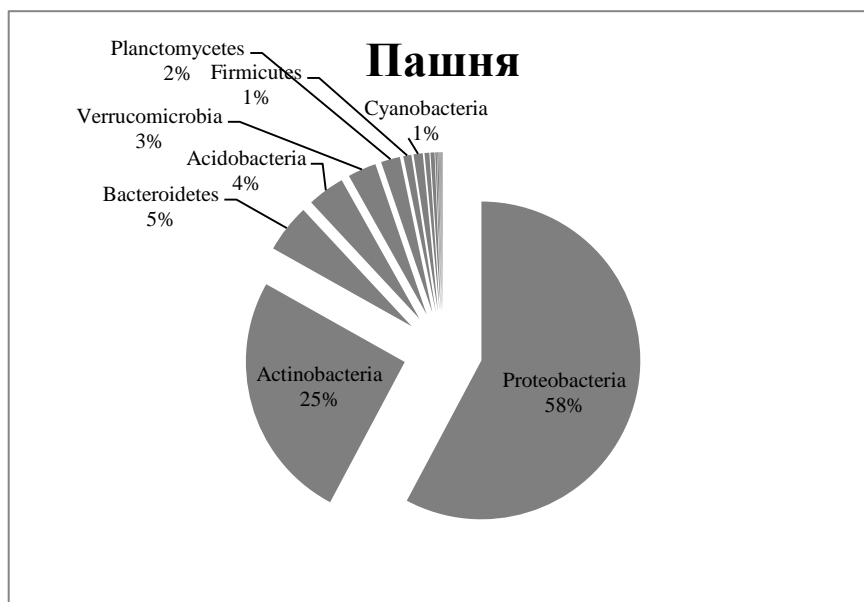


Рисунок 1. Таксономическая структура двух микробиомов в горизонте А чернозема типичного.

Литература:

1. Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Умаров М.М. Особенности микробной трансформации азота в водопрочных агрегатах почв разных типов // Почвоведение. 2001. № 10. С.1261-1267.
2. Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogentic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. 1995. V. 59. P. 143-169.
3. Bates S., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N., A global-scale survey of archaeal abundance and diversity in soils // ISME Journal. 2011. V. 5. P. 908-917.
4. Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR // Environmental Microbiology. 2003. V. 5. P. 787-797
5. N Segata, L Waldron, A Ballarini, V Narasimhan, O Jousson Curtis Huttenhower Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. Nature Methods **9**, 811–814 (2012).



# АНАЛИЗ ФИЛОГЕНИИ ФОТОТРОФНЫХ *CHLOROFLEXI* С ПРИМЕНЕНИЕМ ХАРАКТЕРНОГО ПРОФИЛЯ ДЕЛЕЦИЙ И ИНСЕРЦИЙ В БЕЛКОВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ

**Д.С. Груздев\*, В.А. Гайсин**

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

\*denisgrouzdev@gmail.com

Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ) являются монофилитичной группой фототрофных прокариот, в которой объединены все известные фототрофные представители филума *Chloroflexi*. Последняя таксономическая ревизия фототрофных *Chloroflexi* была предложена в 2013 году (Gupta et al., 2013) на основании сравнительного анализа геномов. За последние два года были выделены и описаны ряд культур новых (АНФБ). Особый научный интерес представляет бактерия «*Candidatus Chloroploca asiatica*» (Gorlenko et al., 2014). Согласно результатам филогенетического анализа и сравнительного анализа морфофизиологических характеристик, эта бактерия представляет собой новый таксон в ранге рода. Таким образом, открыт вопрос о принадлежности бактерии «*Candidatus Chloroploca asiatica*» к тому или иному таксону в ранге семейства и подпорядка.

Для реконструкции филогении и построения внутренне непротиворечивых таксономических схем может использоваться анализ группоспецифичных делеций и инсерций в аминокислотных последовательностях белков бактерий (в англоязычной литературе Conserved Signature Indels (inserts and deletions) далее по тексту CSI). Значение этого метода возросло благодаря значительному прогрессу в определении полных последовательностей геномной ДНК. Так, на основании анализа доступных геномных последовательностей АНФБ, были выявлены CSI, которые были использованы для выделения нового подпорядка *Roseiflexineae* в порядке *Chloroflexales* (Gupta et al., 2013). В данной работе нами были идентифицированы CSI, которые могут решить проблему определения таксономического положения бактерии «*Candidatus Chloroploca asiatica*».

Для поиска CSI специфичных для «*Candidatus Chloroploca asiatica*» была секвенирована полная последовательность геномной ДНК данной бактерии. Секвенирование проводили на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США). Сборка полученных чтений в контиги была проведена с использованием программы SPAdes 3.1. Проведение аннотирования генома

проводили с использованием онлайн сервисов NCBI PGAAP и RAST. CSI были выявлены на основании анализа доступных геномов бактерий порядка *Chloroflexales*. Отобранные нуклеотидные последовательности были транслированы *in silico* в аминокислотные последовательности для выравнивания и анализа CSI. Дендрограмма филогенетических отношений на основании анализа последовательностей гена 16S рНК была построена с помощью программы MEGA 6.06 с применением методов neighbor-joining, minimum evolution и maximum-likelihood.

Результаты анализа последовательностей гена 16S рНК выявили, что мезофильные АНФБ образуют внешнюю по отношению к термофильным представителям клады, которая включала бактерии *Oscillochloris trichoides* DG-6 и «*Candidatus Chloroploca asiatica*» (Рис. 1) Ближайшая родственная бактерия для «*Candidatus Chloroploca asiatica*» является *Oscillochloris trichoides* DG-6. Различие между последовательностями гена 16S рНК данных бактерий составило 90.4%, что соответствует выделению бактерии ранг нового рода. Ветвь, образованная филотипом «*Candidatus Chloroploca asiatica*», входит в состав крупной клады филотипа *Oscillochloris trichoides* DG-6. Объединение этих бактерий в общую кладу получило поддержку благодаря CSI, выявленных в двух белках: C4-dicarboxylate ABC transporter (WP\_044201067) (Рис. 2), biotin\_biosynthesis\_protein\_BioY (WP\_006562445) (Рис. 3).

Результаты анализа группоспецифичных CSI совместно с результатами филогенетического анализа говорят в пользу принадлежности бактерии «*Candidatus Chloroploca asiatica*» к семейству *Oscillochloridaceae*.

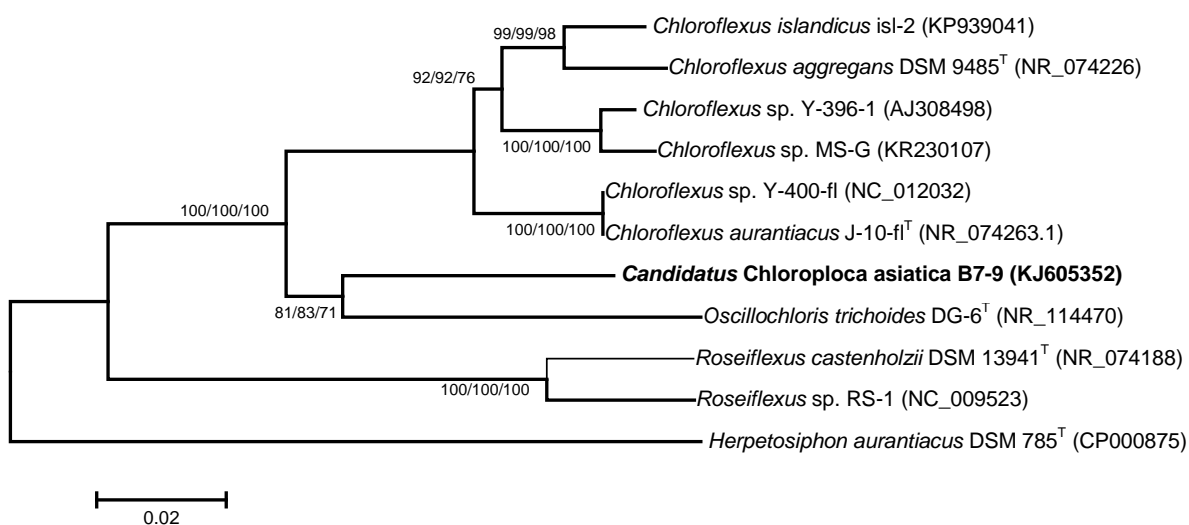


Рисунок 1. Схема фиогенетических отношений внутри группы АНФБ. Дендрограмма построена на основании анализа полных последовательностей гена 16S с использованием

методов neighbor-joining, minimum evolution и maximum-likelihood. Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 1000 альтернативных дендрограмм (результаты представлены через косую черту для каждого соответствующего метода).

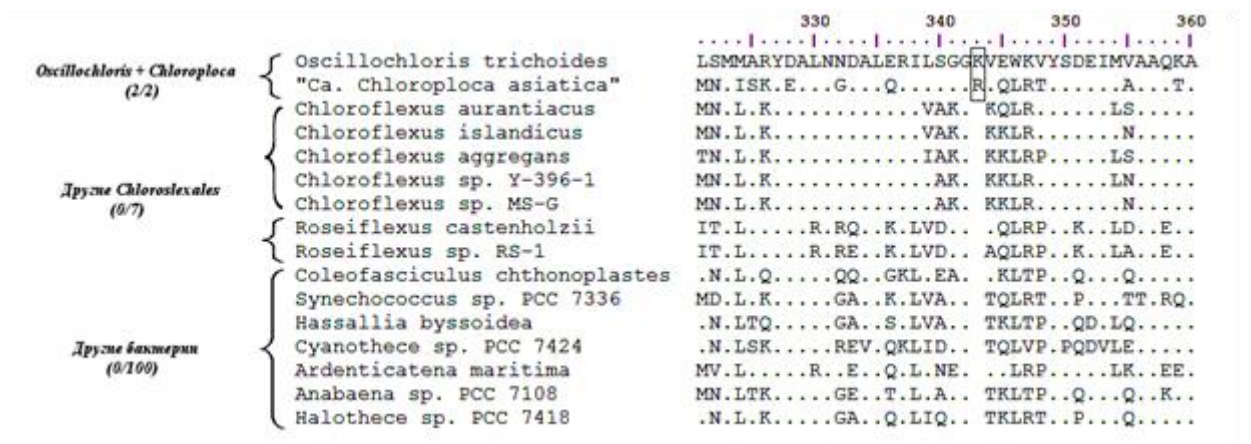


Рисунок 2. Группоспецифичный CSI для бактерий *Oscillochloris trichoides* DG-6 и «*Candidatus Chloroploca asiatica*» в последовательностях белка C4-dicarboxylate ABC transporter.

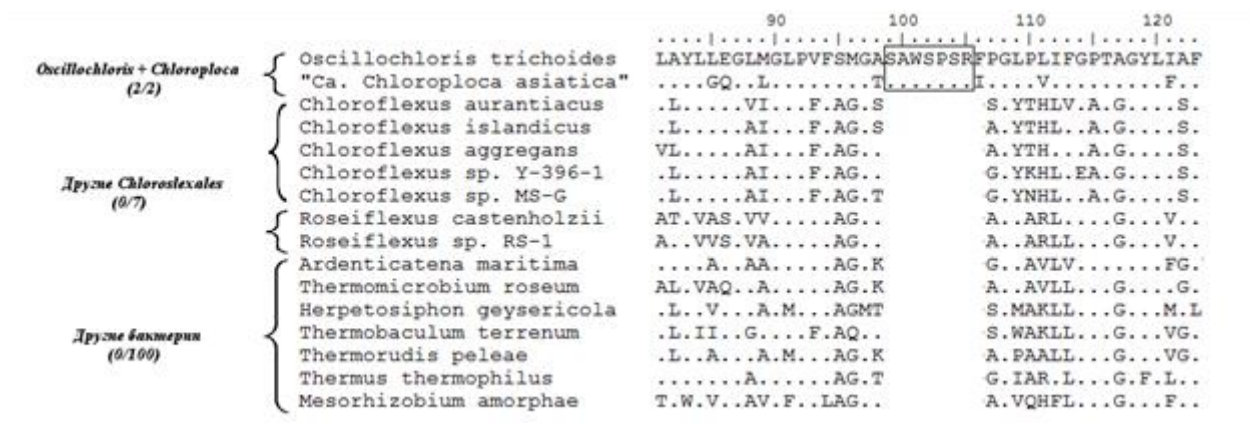


Рисунок 3. Группоспецифический CSI для бактерий *Oscillochloris trichoides* DG-6 и «*Candidatus Chloroploca asiatica*» в последовательностях белка biotin biosynthesis protein BioY.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 16-34-00835 и 16-34-60072.

# ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ МЕТИОНИН- $\gamma$ - ЛИАЗЫ *CLOSTRIDIUM SPOROGENES*

Д.Ж. Давыдов<sup>1</sup>, Н.В. Ануфриева<sup>2</sup>, Е.А. Морозова<sup>2</sup>, В.С. Покровский<sup>1</sup>, Т.В.  
Демидкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический  
научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Метионин –  $\gamma$ -лиаза — пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент (МГЛ, КФ 4.4.1.11), катализирующий реакцию  $\gamma$ -элиминирования L-метионина с образованием метилмеркаптана,  $\alpha$ -кетомасляной кислоты и аммиака. МГЛ, выделенная из различных источников продемонстрировала противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*, и является перспективным агентом для применения в клинической онкологии. В целях наработки МГЛ для проведения доклинических исследований необходимо определение оптимальных условий культивирования продуцентов и экспрессии.

**ЦЕЛЬ.** Сравнить экспрессию МГЛ *C. sporogenes* при различных условиях культивирования.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Штамм *E. coli*/BL21/DE3 был получен в Институте молекулярной биологии им. В.Н. Энгельгардта. Культивирование штамма осуществлялось в стеклянной колбе объёмом 250 мл. Для проведения опытов использовалась жидкая микробиологическая среда ZY с добавлением канамицина для подавления роста посторонней микрофлоры. Посевной материал выращивали в микробиологической пробирке 12 ч в идентичной среде. В колбы для культивирования вносили по 1 мл посевного материала. Экспрессию МГЛ сравнивали при двух различных условиях культивирования (табл. 1).

**Таблица 1. Изученные условия культивирования**

№ пробы	Время внесения	Ингредиенты среды						
		ZY мл.	Глицер. мл.	Глюкоза 20%, мл.	NPS мл.	Лактоза 20% мл.	Кана- мицин мкл.	Инокулят мл.
1	Внесение в момент посева	200,0	2,5	20	8,5	20	5	5
2	Внесение в момент посева	200,0	2,5	10	2,5	–	5	5

Через 3 ч после инокуляции	–	–	5	2,5	–	–	–
Через 6 ч (в начале log-фазы)	–	–	5	2,5	20	–	–

В первую пробу индуктор (лактозу) и макроэлементы (NPS) вносили непосредственно в момент инокуляции посевного материала. Во вторую пробу индуктор вносили в начале log-фазы при оптической плотности среды 0,6 при  $\lambda_{\max} = 600\text{нм}$ , а NPS и глюкозу вносили дробно, с интервалом каждые 3 ч после внесения посевного материала. Клетки культивировали 12 ч. при 37 °С на термостатируемом шейкере Excella E24, New Brunswick Scientific при скорости перемешивания 180 об./мин. Каждые 30 мин отбирали пробы объёмом 1 мл, измеряли оптическую плотность культуры при  $\lambda_{\max} = 600\text{ нм}$  на спектрофотометре Cary 50, Varian После инкубации, биомассу центрифугировали при 10 тыс. об./мин., удаляли супернатант, а осадок разводили в 5 раз буферным раствором (0,1 М КФБ, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ПДФ). Концентрацию белка и активность фермента определяли спектрофотометрически в лизате клеток, который получали путем их разрушения ультразвуком на приборе Qsonica при 50 Гц в течение 10 мин, предварительно добавив PMSF.

Активность препаратов в реакции  $\gamma$ -элиминирования L- метионина определяли по скорости образования  $\alpha$ -кетомасляной кислоты в сопряженной реакции с D2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой. За единицу ферментативной активности принимали количество МГЛ, катализирующее образование 1 мкМ  $\alpha$ -кетобутирата при температуре 37°С в течение 1 мин.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Log-фаза начиналась практически одновременно в обоих случаях, через 6 ч после внесения посевного материала. Общее время инкубации обеих проб было одинаковым, также практически одинаковыми оказались выход клеточной массы после окончания культивирования, концентрация и общее количество белка, а также ферментативная активность (табл. 2).

**Таблица 2.** Результаты эксперимента

№ пробы	Время до выхода на log-фазу, ч	Общее время инкубации, ч	Выход клеточной массы, мг	Концентрация белка, мг/мл	Общее количество белка, мг	Общая активность, ед. (L-Met)
1	6	12	3172	10,728	32,418	2,286
2	6	12	3212	11,271	32,617	2,215

**ВЫВОД.** Продуктивность биомассы клеток не зависит от времени внесения в среду индуктора и периодичности внесения NPS в описанных условиях культивирования. Экспрессия МГЛ существенно не изменяется при добавлении индуктора в начале инкубации или в момент log-фазы. Для упрощения культивирования в лабораторных условиях возможно внесение индуктора и макроэлементов NPS одновременно с посевным материалом.

## **СВОЙСТВА МУТАНТНЫХ ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗ *PENICILLIUM CANESCENS***

**Денисенко Ю.А.<sup>1</sup>, Волков П.В.<sup>1</sup>, Доценко А.С.<sup>1,2</sup>, Булахов А.Г.<sup>1</sup>, Зоров И.Н.<sup>1,2</sup>,  
Гусаков А.В.<sup>1,2</sup>, Рожкова А.М.<sup>1,2</sup>, Синицын А.П.<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

В состав клеточных стенок растений входят целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины, лигнин, белки, а также органические вещества и минеральные элементы. Гемицеллюлозами называется большая группа щелочерастворимых полисахаридов растений, мономерами которых являются ксилоза, арабиноза, манноза, глюкоза, галактоза, фукоза. К числу гемицеллюлоз относятся ксиланы, ксилоглюканы, маннаны, галактаны и др. Наиболее распространен среди гемицеллюлоз ксилан.

Эндо-1,4-β-ксилаказы (далее ксиланы) катализируют неупорядоченное расщепление β-1,4-ксилозидных связей в ксиланах и являются важным компонентом ферментных комплексов, применяемых в целлюлозно-бумажной промышленности, а также в хлебопечении и в качестве добавок к кормам сельскохозяйственных животных и птиц.

В целях поиска мутантных форм ксиланазы *A Penicillium canescens* с увеличенной термостабильностью методом сайт-направленного мутагенеза мной был произведен ряд одинарных аминокислотных замен: L18F, H191R, T104E, T160D, I6V, I6L, K9L, Y125R A293P; и произведена двойная замена G83C/I124C. Полученные векторы были клонированы в *Penicillium verruculosum* под контролем промотора гена *cbh1*. Выбор проводимых аминокислотных замен определялся основными подходами для увеличения термостабильности белковой глобулы: создание ионных пар (H191R, T104E, T160D, K9L, Y125R), уплотнение гидрофобных участков фермента (L18F, I6V, I6L), ужесточение третичной структуры за счет введения пролина (A293P), образование дисульфидных

мостиков (G83C/I124C). Экспрессии некоторых мутантных форм фермента не наблюдалось (T104E; T160D; K9L). Другие мутантные формы ксиланазы А были выделены из соответствующих ферментных препаратов в гомогенном виде (по данным ПААГ-электрофореза) с помощью последовательных стадий хроматографического разделения (обессоливание, анионообменная хроматография, гидрофобная хроматография). Для идентификации аминокислотных замен использовали МАЛДИ масс-спектрометрию. Исследование таких параметров, как каталитическая активность, температурная и рН зависимости активности, субстратная специфичность показало, что мутации не привели к значительным изменениям этих свойств. Изучение термостабильности ферментов при 40, 50, 55 и 60°C по остаточной ксиланазной активности установило, что замены S246P, Y125R, H191R и Y125R привели к дестабилизации фермента; замены G83C/I124C, I6V и I6L не повлияли на температурную стабильность, одинарная замена L18F привела к значительной стабилизации ксиланазы А. Изменение термостабильности мутантных форм подтверждалось изменением температуры фазового перехода гомогенных ферментов методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии.

Соглашение о субсидии 14.607.21.0050 от 25.08.2014.

## **АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ ШТАММОВ *ARTHROBACTER AGILIS* LUSH13 И *MICROBACTERIUM SPECIES* B51 В МОДЕЛЬНЫХ СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ**

**Н. С. Егозарьян<sup>1,3</sup>, И. П. Соляникова<sup>1</sup>, Н. Е. Сузина<sup>1</sup>, В. Н. Поливцева<sup>1</sup>,  
Л. А. Головлёва<sup>1</sup>, А. Л. Мулюкин<sup>2</sup>, Г. И. Эль-Регистан<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Россия

<sup>2</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Современная деятельность человека часто ведет к загрязнению окружающей среды промышленными отходами, к числу которых относятся такие опасные химические соединения как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), полигалогенированные фенолы, хлорбифенилы (ПХБ). Особая роль в деградации токсикантов отведена микроорганизмам-деструкторам, способным использовать

в качестве источника углерода и энергии синтетические соединения. Однако зачастую неблагоприятные для роста физические факторы окружающей среды предполагают смену стратегии роста бактерий на стратегию переживания и перехода в состояние покоя.

В настоящее время достаточно освещены аспекты выживания и образования цистоподобных клеток неспорообразующих бактерий в условиях стресса, вместе с тем оценка жизнеспособности, биодegradативного потенциала и, наконец, процессы выхода из цистоподобного состояния (ЦПС) остаются неизученными.

Цель работы – исследование жизнеспособности и особенностей субстрат-зависимых ультраструктурных перестроек клеток штаммов неспорообразующих бактерий *Arthrobacter agilis* Lush13 и *Microbacterium species* B51 в модельных стрессовых условиях.

В качестве объектов настоящего исследования были использованы клетки штаммов актинобактерий двух родов - *Arthrobacter* и *Microbacterium*, выделенные из образцов микроорганизмов полевой почвы (г. Пушкино, Московская область) и почвы промышленной зоны (г. Березники, Пермский край) соответственно.

Изучение динамики прорастания ЦПК модельных штаммов проводили путём внесения 10 мкл клеточной суспензии на чашку Петри с агаризованной богатой средой. Прорастание в жидкой среде проводили путём внесения по 100 мкл клеточной суспензии в пробирку с 10 мл среды LB. Пробы отбирали через 30 мин и каждый час в течение 14-24 часов до появления визуально-видимого роста. Клетки собирали центрифугированием (20°C, 3 мин, 16000 g), ресуспендировали в 500 мкл 2%-ного раствора глутарового альдегида в 0,05М какодилатном буфере (pH 7,2). Препараты просматривали в световом микроскопе с детекцией изображения для каждого варианта и, далее, осуществляли процедуру препарирования и приготовления ультратонких срезов. Ультратонкие срезы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1200EX (JEOL) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для исследования биодegradативной активности штаммов применяли минеральную среду следующего состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0.73;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.35;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1;  $\text{NaHCO}_3$  – 0.25;  $\text{MnSO}_4$  – 0.002;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0.75;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.02. В качестве единственного ростового субстрата добавляли токсиканты: фенол, моно-, ди- и пентахлорфенол – 50 мг/л. Бензоат – до 300 мг/л. Хлорбензоаты – 100 мг/л. Клетки выращивали на LB среде и инокулировали минеральную среду с соответствующим ростовым субстратом в объеме 100 мл.

В результате исследования было выявлено, что переход к вегетативному росту покоящихся клеток (ПК) *A. agilis* Lush13 сопровождается распадом образовавшихся конгломератов ультрамелких клеточных форм на единичные клетки, постепенным



изменением структуры цитоплазмы, её уплотнением, последующим активным ростом и делением клеток и одновременным формированием плотного внеклеточного и межклеточного фибриллярного матрикса - «кокона» (рис.1).

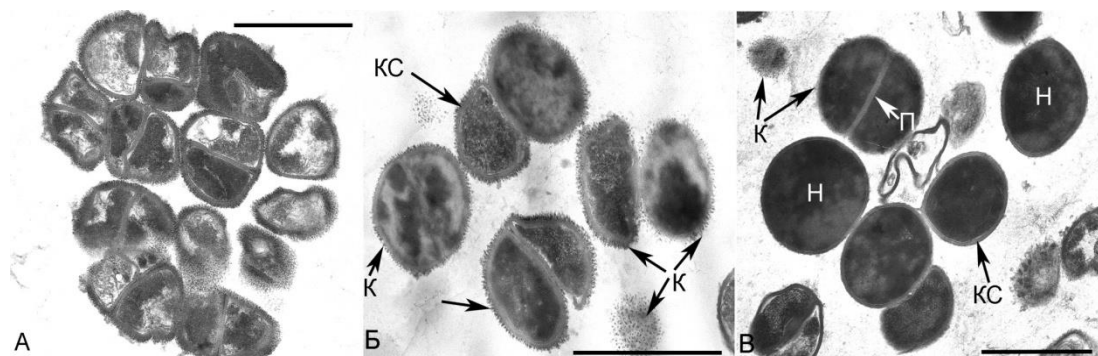


Рис. 1. Ультратонкие срезы клеток *A. agilis* Lush 13 в процессе выхода из состояния покоя: через 1 час (А) и через 6 часов (Б, В) после начала культивирования на среде LB. КС – клеточная стенка; П – перегородка; К – капсула; Н – нуклеоид. Электронная микроскопия. Длина масштабной линейки 1мкм.

Переход к вегетативному росту ПК *Microbacterium* sp. B51 (рис. 2) характеризуется формированием крупных клеточных форм - полиплоидов, объем цитоплазмы и нуклеоплазмы которых ~ в 40 раз превышает объемы вегетативных клеток, последующим разделением нуклеоплазмы на дискретные нуклеоиды и множественным дроблением крупных клеток на ультрамелкие «мононуклеоидные» клеточные формы (объемом 0,01 – 0,02 мкм<sup>3</sup>).

Показано, что длительное хранение исходных вегетативных клеток *Microbacterium* sp. B51 на среде с токсикантами сопровождается частичным лизисом и дроблением интактных клеток, формированием в популяции преимущественно мелких палочек и коротких овоидов. Длительное хранение исходных вегетативных клеток *A. agilis* Lush13 на среде с токсикантами приводит к формированию популяции, практически полностью состоящей из рефрактерных клеток-цистоидов.

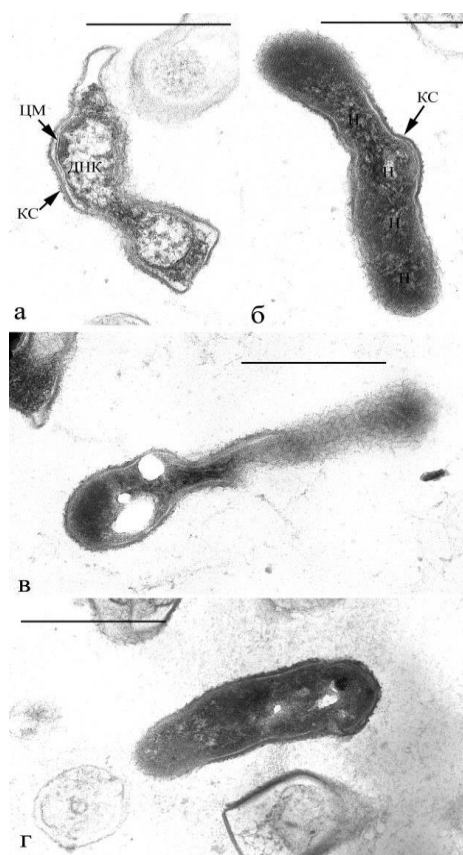


Рис. 2. Ультратонкие срезы «прорастающих» клеток *Microbacterium* sp. B51: через 0,5 часов культивирования на среде 5/5 (а, б); через 2 часа культивирования (в); 4 часа культивирования (г). Электронная микроскопия. Длина масштабной линейки 0,5 мкм.

Таким образом, экспериментально установленный период длительной адаптации (до 3-х месяцев) клеток к новым субстратам может включать в себя в качестве промежуточного этапа переход клеток в ЦПС с последующим выходом из состояния покоя и началом роста популяции с использованием нового субстрата.

Полученные данные обосновывают понимание процессов, происходящих в микробных клетках в условиях воздействия токсичных соединений, раскрывая важные аспекты биотехнологического использования штаммов. Результаты настоящего исследования могут быть применены при разработке приёмов консервации штаммов-деструкторов с целью длительного хранения биопрепаратов.

Работа поддержана РФФ (грант № 14-14-00368).

# РОЛЬ 11-ГЕМОВОГО ЦИТОХРОМА В ЖЕЛЕЗОРЕДУКЦИИ У ТЕРМОФИЛЬНОЙ МЕТАЛЛ-ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *CARBOXYDOTHERMUS* *FERRIREDUCTENS*

**Елизаров И.М.(1), Дергоусова Н.И.(2), Тихонова Т.В.(2), Ямскова О.В.(3), Гаврилов  
С.Н.(1)**

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

(2) ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва,  
Россия

(3) ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова, Москва, Россия

Детали процесса железоредукции у грамположительных бактерий изучены слабо, в то время как модельными железоредукторами являются мезофильные грамотрицательные бактерии *Geobacter sulfurreduces*, *G. metallireducens* и *Shewanella oneidensis*.

Для данного исследования был выбран *Carboxydothemus ferrireducens* – представитель порядка *Clostridiales*, имеющий оптимальную температуру роста 67 °С и способный восстанавливать соединения железа, в том числе и растворимые, соединения урана-6, а также способный к электрогенезу на химически инертных электродах. При использовании ферригидрита в качестве акцептора электронов, данный микроорганизм способен расти как органотрофно, так и автотрофно с водородом в качестве энергетического субстрата и CO<sub>2</sub> в качестве источника углерода. На органических кислотах и спиртах в присутствии диоксида углерода и акцептора электронов, *C. ferrireducens* растет гомоацетогенно.

В геноме *C. ferrireducens* был обнаружен кластер генов, кодирующий пили и трансмембранный цитохромный комплекс, который, как предполагается, является основной детерминантой железоредукции у модельных микроорганизмов. Также геном *C. ferrireducens* содержит несколько генов, кодирующих мультигемовые цитохромы с-типа и не входящих в предполагаемый пилин-цитохромный оперон, в том числе гены с ОРС № WP\_028052385 и WP\_028051696, кодирующие два мультигемовых цитохрома, далее обозначаемых как 385 и 696.

Экспрессия 11-гемового цитохрома 696 наблюдалась при наличии нерастворимых соединений железа-3 в среде даже в микромолярных количествах (100-300 μМ). Также данный цитохром был детектирован методами протеомики при росте на фумарате, ферригидрите, растворимых соединениях железа-3 и на аноде микробного топливного

элемента с потенциалом +240mV, что превышает разность потенциалов между ферригидритом и магнетитом. В экспериментах по отмывке магнетита, при помощи масс-спектрометрии было показано, что цитохром 696 остается в магнетитной фракции среды даже после отмывки магнетита от клеток при помощи детергентов. В то же время, цитохром 385 был детектирован протеомными методами только на ферригидрите. При этом, по данным транскриптомики, 12-гемовый цитохром 385 активнее всего экспрессируется в присутствии альгината железа-3. Это указывает на важную роль мультигемовых цитохромов *c*, не входящих в предполагаемый пилин-цитохромный комплекс, для процесса железоредукции у данного микроорганизма.

Из выше описанного следует, что цитохром 696 экспрессируется конститутивно и является важным компонентом в цепи внеклеточного переноса электронов. Экспрессия цитохрома 385 нестабильна и факторы, влияющие на его экспрессию, определены не полностью, однако он, играет важную роль в переносе электронов на нерастворимые минералы и органические хелаты железа. Последний процесс может играть важную роль в осадочных местообитаниях, где за счет присутствия большого количества биополимеров, железо будет с большой вероятностью находиться в хелатированной форме.

## **АНАЛИЗ ГЕНОМА ТЕРМОФИЛЬНОГО ПЛАНКТОМИЦЕТА *THERMOGUTTA TERRIFONTIS***

**Ельченинов А.Г.<sup>1</sup>, Menzel P.<sup>2</sup>, Gudbersdottir S.R.<sup>2</sup>, Krogh A.<sup>2</sup>, Бонч-Осмоловская Е.А.<sup>1</sup>, Кубланов И.В.<sup>1</sup>.**

1 – Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Ботехнологии РАН, Москва, Россия.

2 – University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

Бактерия *Thermogutta terrifontis* [1] была описана в 2015 году, став первым термофильным представителем филума *Planctomycetes*. Позже был секвенирован и полностью собран геном этого микроорганизма (размер генома составил примерно 4,8 млн. п.н.). Как и большинство известных планктомицетов *T. terrifontis* растет на разнообразных сахарах – от моно- до полисахаридов. Данная работа посвящена *in silico* исследованию ферментов, участвующих в разложении сахаров.

В ходе анализа генома *T. terrifontis* мы обнаружили более 100 генов, кодирующих гликозидазы, и 13 генов, кодирующих полисахаридлиазы, что обуславливает возможность

*T. terrifontis* использовать различные ди-, олиго- и полисахариды в качестве единственного источника углерода, разлагая их до моносахаридов. Нами были реконструированы реакции деструкции олиго- и полисахаридов, на которых был показан рост данного планктомицета [1]: трегалоза, сахароза, целлобиоза, крахмал, пектин, ксилан и ксантановая камедь. Образующиеся моносахариды в дальнейшем разлагаются в ходе реакций гликолиза (гексозы) и пентозофосфатного пути (пентозы). Нами были обнаружены все гены, кодирующие ферменты, участвующие в гликолизе. Образующийся в результате гликолиза пируват далее окисляется с помощью пируватдегидрогеназного комплекса до ацетил-КоА, который либо поступает в цикл трикарбоновых кислот, либо превращается в ацетат. Также в геноме *T. terrifontis* были найдены все гены, за исключением гена трансальдолазы, ответственные за синтез белков, которые катализируют реакции пентозофосфатного цикла. В том случае если в среде нет акцептора, *T. terrifontis* может бродить, продуцируя ацетат, лактат и водород. Помимо этого данный микроорганизм обладает способностью к аэробному или анаэробному дыханию в присутствии внешнего акцептора электронов (кислорода или нитрата, соответственно). Последнее свойство также является необычным для известных планктомицетов и детерминируется нитратредуктазой Nar и нитритредуктазой Nrf, гены которых также были выявлены в геноме данного микроорганизма.

1. Slobodkina G.B., Kovaleva O.L., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Kolganova T.V., Novikov A.A., van Heerden E., Bonch-Osmolovskaya E.A., 2015. *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes*.

## ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ ИЗ ШТАММОВ *ACINETOBACTER* *LWOFFII*

**Ермакова А.Я.<sup>1</sup>, Белецкий А.В.<sup>1</sup>, Ракитин А.Л.<sup>1</sup>, Петрова М.А.<sup>2</sup>, Марданов А.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биоинженерии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Грамотрицательные бактерии рода *Acinetobacter* относятся к семейству *Moraxellaceae*, они широко распространены в природе, некоторые виды являются патогенными. Лечение инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.*, осложняется наличием механизмов резистентности, которые обеспечивают устойчивость ко многим

антибиотикам:  $\beta$ -лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, полимиксином, карбапенемам. Большинство полирезистентных штаммов относятся к виду *A. baumannii*.

Ранее в нашей лаборатории были просеквенированы геномы пяти штаммов *Acinetobacter lwoffii*, выделенных из многолетнемерзлых образцов грунтов (от 15 тыс лет до 3 млн. лет, Колымская низменность, Якутия). В результате анализа геномных последовательностей в четырех штаммах были обнаружены интегрированные в хромосому геномы бактериофагов. Размеры этих геномов составляют от 11 до 69 т.п.н. Интеграция бактериофагов *Acinetobacter phage* ED4523-1, VS15-1 и ED9\_5a-1 происходит в гены транспортной РНК, бактериофаг *Acinetobacter phage* EK30A-1 встраивается в ген транспортно-матричной РНК. ПЦР анализ геномной ДНК соответствующих штаммов показал, что умеренные фаги ED4523-1, ED9\_5a-1 и EK30A-1 могут находиться как в интегрированной в хромосому форме, так и вырезаться из хромосомы т.е. они являются функционально активными. Данные электронной микроскопии подтвердили наличие вирионов в образцах культуральной жидкости.

Аминокислотные последовательности белков бактериофагов, полученные при анализе открытых рамок считывания, сравнивали с базой данных BLAST. В исследуемых геномах были обнаружены белки, гомологичные известным интегразам, терминазам, структурным белкам бактериофагов разных видов. Филогенетический анализ на основе последовательностей белков оболочки показал, что бактериофаги *Acinetobacter phage* ED4523-1 и ED9\_5a-1 относятся к лямбда-подобным фагам семейства *Siphoviridae*, а бактериофаг *Acinetobacter phage* EK30A-1 к P2-подобным фагам семейства *Myoviridae*.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-01317.

## **УСТОЙЧИВОСТЬ К ИОНАМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ШТАММОВ АРХЕЙ РОДА *ACIDIPLASMA***

**Т. В. Ерофеева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН

### **Введение.**

Биогидрометаллургические технологии широко применяются в металлургической промышленности для добычи цветных и благородных металлов из сульфидных руд. Принципом, на котором основаны данные технологии, является разрушение

кристаллической решетки сульфидных минералов ацидофильными железомикробами и сероокисляющими микроорганизмами. Вследствие активного промышленного использования биовыщелачивания данные микроорганизмы вызывают большой интерес исследователей и активно изучаются. В настоящий момент в научной литературе присутствует достаточно большое количество данных по этим микроорганизмам.

Окислители сульфидных минералов представляют собой филогенетически неоднородную группу. В нее входят представители нескольких филумов доменов *Bacteria* (*Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Firmicute*, *Actinobacteria*) и *Archaea* (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*)

Рядом работ было показано, что одной из доминирующих групп микроорганизмов в процессах биовыщелачивания являются археи рода *Acidiplasma* семейства *Ferroplasmaceae*.

Археи семейства *Ferroplasmaceae* распространены в местах обитания, характеризующимися низким значением pH, таких как месторождения сульфидных руд, шахты и карьеры, кислые геотермальные источники. Представители семейства *Ferroplasmaceae* разделяются на два рода: *Acidiplasma* и *Ferroplasma*. Отличительной особенностью этих микроорганизмов является отсутствие клеточной стенки. Из-за этого клетки не имеют постоянной формы. Размножаются данные археи почкованием. Липидная мембрана состоит из молекул глицеринового эфира фитанила. Благодаря этому их мембрана малопроницаема для протонов, что делает данных архей устойчивыми к крайне низким значениям pH. Представители обоих родов достаточно близки по физиологическим свойствам, однако последовательности их генов 16S рРНК образуют два отдельных кластера, кроме того представители *Acidiplasma* являются умеренно термофильными микроорганизмами.

По физиологическим свойствам изученные штаммы рода *Acidiplasma* различаются мало. Они являются умеренными термофилами и экстремальными ацидофилами. Оптимальная для роста температура лежит в диапазоне от 45 до 55 °С. Оптимальные значения pH достаточно низкие (около 1.0). Штамм *A. aeolicum* V<sup>T</sup> способен расти даже при нулевом значении pH. Являясь аэробными окислителями железа, нуждаются в органическом источнике углерода и способны к гетеротрофному росту. В лабораторных условиях для их культивирования обычно используется дрожжевой экстракт (ДЭ). Так как данные археи получают энергию за счет окисления сульфидных минералов, места их обитания зачастую характеризуются высокими концентрациями ионов тяжелых металлов.

## Цель работы.

Значение ацидофильных микроорганизмов в процессах биовыщелачивания является доказанным, но, несмотря на это, некоторые аспекты их физиологии остаются неизученными. В частности, в литературе отсутствует информация об устойчивости архей рода *Acidiplasma* к ионам тяжелых металлов. При этом ионы тяжелых металлов зачастую присутствуют в местах обитания в высоких концентрациях из растворения в процессе окисления сульфидных минералов. В виду практической значимости штаммов ацидиплазм было бы интересно и с фундаментально-научной и биотехнологической точек зрения исследовать устойчивость этих архей к ионам тяжелых металлов.

Целью данной работы является изучение устойчивости штаммов архей рода *Acidiplasma* к ионам меди и цинка. В экспериментах были использованы именно эти металлы, так как немалая часть запасов меди и цинка сосредоточена в сульфидных рудах полиметаллических медно-цинковых месторождений.

Влияние меди и цинка на рост микроорганизмов и их окислительную активность оценивали по количеству клеток микроорганизмов в жидкой среде и по скорости окисления двухвалентного железа до трехвалентного.

Использовались следующие штаммы архей:

*Acidiplasma* sp. МВА–1, полученная из музея лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН;

*A. cupricumulans* ВН2<sup>T</sup>, полученный из коллекции DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)).

Для проведения опытов использовалась среда, содержащая 5 г/л Fe<sup>2+</sup> и 0.02% ДЭ в качестве питательных субстратов. Для проведения экспериментов в среду добавляли тяжелые металлы (Cu<sup>2+</sup> или Zn<sup>2+</sup>) в виде сульфатов в следующих концентрациях: 0 мМ, 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ, 250 мМ, 500 мМ, 750 мМ, 1000 мМ. Таким образом, можно было выявить влияние различных концентраций металла на штаммы архей. Продолжительность экспериментов составляла 10 суток, эксперименты проводили при 50°C – при температуре близкой к оптимальной для обоих штаммов. Пробы отбирались каждые 48 часов. Подсчет клеток проводился на фазово-контрастном микроскопе, а концентрация окисленного и восстановленного железа определялась спектрофотометрически с помощью роданидного метода. Данный метод позволяет проводить измерение концентрации ионов железа в присутствии ионов цветных металлов



благодаря низкой чувствительности к примесям. Дополнительно для оценки процесса окисления железа на протяжении эксперимента проводилось измерение окислительно-восстановительного потенциала.

В геномах штаммов, депонированных ранее в базе данных NCBI GenBank под номерами JYNS00000000.1 и LKBH00000000.1 был осуществлен поиск генов, кодирующих белки, которые потенциально могут обуславливать устойчивость к ионам металлов.

### **Результаты.**

Устойчивость штаммов к ионам тяжелых металлов оценивалась по урожайности (количество клеток в жидкой фазе), величине окислительно-восстановительного потенциала и концентрации двухвалентного железа. По этим данным можно сказать, что оба штамма были способны к окислению железа во всем диапазоне концентраций меди и цинка (0 мМ – 1000 мМ). Однако при концентрациях меди выше 10 мМ и цинка выше 50 мМ скорость окисления железа обоими штаммами существенно снижалась по сравнению с контролем (среда без меди и цинка).

Ионы тяжелых металлов ингибировали рост микроорганизмов. При концентрации меди выше 10 мМ и цинка выше 50 мМ увеличения численности клеток штамма МВА–1 не наблюдалось. Численность клеток штамма ВН2<sup>Т</sup> не увеличивалась при концентрациях меди и цинка в среде выше 10 мМ.

В геномах штаммов были обнаружены гены ABC (ATP-binding cassette transporters) и MFS (major facilitator superfamily) транспортеров, которые могут участвовать в удалении ионов тяжелых металлов из цитоплазмы, а также гены белков, способных к связыванию меди (copper-binding proteins). Кроме того, в геномах были обнаружены белки семейства Ars, ответственные за устойчивость к мышьяку.

Результаты работы показывают, что изученные штаммы рода *Acidiplasma* обладают весьма высокой устойчивостью к ионам тяжелых металлов, что может являться причиной их доминирования в технологических процессах.

# МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НОВОЙ ПСИХРОАКТИВНОЙ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ

В. А. Зайчиков<sup>1</sup>, Ю. Ю. Берестовская<sup>2</sup>, Л. В. Васильева<sup>2</sup>, А. М. Семенов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва,  
Россия

<sup>2</sup>Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

Аэробные метиловобактерии — группа метилотрофных прокариот, использующих в качестве источников углерода и энергии окисленные или замещенные производные метана, но не сам метан.

Аэробные метиловобактерии широко распространены в природе. Виды, относящиеся к разным таксономическим группам, выделяли из почв, образцов воздуха, питьевой воды, пресных и соленых водоемов, морей и содовых озер. Кроме того, метиловобактерии колонизируют листовую поверхность, корни и семена растений, образуя при этом симбиотическую трофическую ассоциацию. Метиловобактерии потребляют метанол, образующийся при разложении пектина, и взамен образуют фитогормоны и витамины, стимулирующие рост растений. Таким образом, метанолюкисляющие аэробные метиловобактерии образуют своеобразный газовый фильтр на пути поступления метанола в атмосферу. Кроме того, метиловобактерии потребляют и другие продукты неполного окисления метана, а также метиламины, тем самым замыкая круговорот одноуглеродных соединений в природе. Некоторые представители метиловобактерий способны расщеплять токсичные ксенобиотики, в частности, галометаны, которые образуются как естественным путем, так и в результате деятельности человека.

Исследованы морфо-физиологические особенности факультативно метилотрофной психротолерантной бактерии (штамм 1601), выделенной из сезонно-талого горизонта почвы тундры Аляски. Показано, что клетки нового штамма имеют форму палочек размером 0,5 x 1,3–4,5 мкм. Молодые клетки обладают подвижностью. Микроорганизм размножается неравномерным делением. Характерным для штамма 1601 является способность к формированию розеток. Наряду с одноуглеродными соединениями, клетки нового организма используют широкий спектр полиуглеродных субстратов. Бактерия растет в пределах температур 4–30 °С с оптимумом при 25–28 °С и в пределах рН 4.0–7.8 с оптимумом при рН 6.5. Клетки растут без изменения типичной морфологии в узком

интервале концентраций NaCl в среде (до 1.0%). Сравнительный анализ гена 16S рРНК показал, что штамм 1601 относится к известному виду рода *Methylosula* — *M. polaris*.

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОГЕОГРАФИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ АНТАРКТИДЫ

**В. А. Иванов<sup>1,2</sup>, А. В. Комова<sup>1</sup> З. Б. Намсараев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, кафедра НБИК-технологий

Широкое применение молекулярно-биологических методов для анализа состава микробных сообществ в различных регионах Земли привело к интенсивному развитию исследований в области биогеографии микроорганизмов. В результате было показано, что существуют различные типы биогеографического распределения микроорганизмов, обусловленные как экологическими особенностями таксона, так и историей его распространения по Земле (Gaisin et al., 2016). Ранее Намсараевым и соавторами впервые было проведено исследование биогеографического распространения микроорганизмов в масштабе континента на примере цианобактерий наземных экосистем Антарктиды (Namsaraev et al., 2010). В результате было показано, что в Антарктиде присутствуют как космополитные группы цианобактерий, распространенные по различным регионам Земли включая регионы с теплым и жарким климатом, так и потенциально эндемичные группы, на настоящий момент обнаруженные только на территории Антарктиды. Кроме того существует группы имеющие космополитное распространение, но при этом приуроченные к холодным местообитаниям («холодные космополиты»), таким как Антарктида, Арктика, Тибет, Альпы и т.д.

Целью нашего исследования является изучение молекулярного разнообразия и биогеографии цианобактерий во всех типах экосистем Антарктиды, включая наземные, озерные, морские, ледниковые, а также цианобактерий обнаруженных при изучении воздушной среды. Для этого с сервиса Genbank было загружено 172979 сиквенсов 16S рРНК принадлежащим цианобактериям и неидентифицированным некультивируемым бактериям (по состоянию на 19.07.16). Кроме того, с сайта Integrated Microbial Genomes & Microbiomes JGI DoE было загружено 21570 бактериальных сиквенсов 16S рРНК относящихся к 65 метагеномным проектам (по состоянию на 13.07.16). Полученная база данных была проанализирована с использованием сервиса RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.10, который позволил сократить базу данных до 5964 сиквенсов за счет

удаления сиквенсов не являющихся цианобактериями. Также были удалены сиквенсы определенные как хлоропласты. На следующем этапе был проведен поиск химер с использованием сервиса Decipher. При этом база данных сократилась до 3178 сиквенсов. После этого сиквенсы были выровнены с использованием программы Usearch и из сиквенсов были вручную удалены последовательности ITS расположенные после гена 16S рРНК, а также сиквенсы длиной менее 50 п.о. Оставшиеся сиквенсы были кластированы в OTU с использованием программы Usearch при уровне сходства 97%. Было получено 339 операционных таксономических единицы, центроидные сиквенсы которых были проанализированы с помощью программы Blast. Полученная информация была проанализирована с помощью программы «Sortirator», которая позволяет анализировать географическую информацию из раздела Features сиквенса на сайте Genbank (Свидетельство № 2016616066). В дальнейшем полученная информация была повторно проанализирована на предмет наличия ошибочно идентифицированных программами сиквенсов, не относящихся к Антарктиде, принадлежащих к хлоропластам, с отсутствующими географическими данными и т.д. Итоговое количество сиквенсов цианобактерий обнаруженных в Антарктиде составляет 2865, итоговое количество OTU 447. Затем были уточнены географические координаты оставшихся последовательностей, их распределение по экологическим группам и таксономическая информация.

В результате проведенного исследования было обнаружено, что большинство антарктических сиквенсов цианобактерий было получено из водных местообитаний, к которым относятся озера, сипы, ручьи – 1541 сиквенс. Из наземных местообитаний (почва, эндолитические сообщества, биопленки и т.д.) – 944 сиквенса, из ледниковых местообитаний (криокониты, ледниковые керны и т.д.) – 178 сиквенсов, морских сиквенсов – 1, из воздушной среды – 1. Неидентифицирован тип местообитания у 200 сиквенсов. Географическое распределение OTU показало, что наибольшее количество сиквенсов цианобактерий было обнаружено в районе Земли Виктории и Земли Грейама (северная часть Антарктического полуострова), в которых было обнаружено 1015 сиквенсов и 156 OTU, и 743 сиквенса и 119 OTU соответственно (данные по секторам 15 на 15 градусов). Анализ биогеографического распределения показал, что наибольшее количество OTU имеет космополитное распространение - 258, являются холодными космополитами 46 OTU. Потенциально эндемичными для Антарктиды является 34 OTU. Определение географического распределения у 1 OTU не могло быть выполнено. 108 OTU являлись синглтонами и имели только 1 сиквенс в составе OTU. Таксономический анализ OTU (по числу наиболее представленных идентифицированных цианобактерий) обнаруженных в Антарктиде показал, что наиболее распространены представители

порядков: Oscillatoriales - 102, Pseudanabaenales - 59, Nostocales - 43, Synechococcales – 23, Chroococcales – 12. Не имеют идентифицированных представителей 100. В порядке убывания по количеству идентифицированных OTU представлены роды *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidesmis*, *Geitlerinema*, *Synechococcus*, *Pseudanabaena*, *Tychonema*, *Tolypothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloea*, *Chroococcidiopsis*, *Anabaena*, *Cyanobium*, *Nodularia*, *Macrochaete*, *Hormosilla*, *Lyngbya*, *Nodosilinea*, *Rivularia*, *Aphanocapsa*, *Arthrospira*, *Calothrix*, *Crinalium*, *Fischerella*, *Halotia*, *Limnothrix*, *Loriellopsis*, *Merismopedia*, *Oculatella*, *Petalonema*, *Planktothrix*, *Plectolyngbya*, *Pseudophormidium*, *Roholtiella*, *Scytonema*, *Synechocystis*.

Разработанный метод анализа биогеографической информации содержащейся в базах данных генетической информации позволил впервые провести анализ всего известного цианобактериального разнообразия Антарктиды. Данный подход может быть использован для анализа географического распределения не только генов 16S рРНК, но и других генов, в том числе функциональных.

1. Gaisin, V. A., Grouzdev, D. S., Namsaraev, Z. B., Sukhacheva, M. V., Gorlenko, V. M., & Kuznetsov, B. B. (2016). Biogeography of thermophilic phototrophic bacteria belonging to Roseiflexus genus. FEMS microbiology ecology, 92(3), fiw012.
2. Namsaraev, Z., Mano, M.J., Fernandez, R. and Wilmotte, A. (2010) Biogeography of terrestrial cyanobacteria from Antarctic ice-free areas. Annals of Glaciology, Vol. 51, No. 56, p. 171-177.
3. Свидетельство № 2016616066. Программа для ЭВМ «Sortirator»: свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ / З. Б. Намсараев, Р. О. Алиев, А. В. Комова; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт». - № 2016613169; заявл. 06.04.2016; зарегистр. 03.06.2016. - 1 с.

## **МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ ТУНДРОВЫХ ЭКОСИСТЕМ СУБАРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ РОССИИ**

**А.А. Иванова<sup>1</sup>, И.С. Куличевская<sup>1</sup>, С.Н. Дедыш<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Москва

*Planctomycetes* – широко распространенная филогенетическая группа бактерий, населяющих наземные, морские и пресноводные экосистемы (Fuerst and Sagulenko, 2011;

Jeske et al., 2013). Как показали молекулярные исследования последнего времени, планктомицеты особенно многочисленны в торфяных болотах бореального пояса, где они составляют до 13% от общей численности бактерий (Dedysh et al., 2006; Ivanova and Dedysh, 2012; Serkebaeva et al., 2013). В наземных экосистемах тундры планктомицеты также составляют репрезентативную группу микроорганизмов (Steven et al., 2013), однако их разнообразие до последнего времени оставалось неизученным. Так как в числе таксономически описанных планктомицетов нет психрофильных представителей, вопрос о природе населяющих тундру планктомицетов оставался открытым. Настоящая работа ставила своей целью изучение экологии и разнообразия планктомицетов в микробных сообществах двух экосистем, типичных для тундровой зоны России - плоскобугорчатого сфагново-лишайникового болота и ягельной лесотундры.

Для анализа были использованы образцы торфа и почвы, отобранные с глубины 3-8 см профилей сфагново-лишайникового болота (Ямало-Ненецкий АО N65°35'01''; E073°03'06'') и ягельной лесотундры (Ямало-Ненецкий АО N65°36'52''; E072°43'33''), соответственно. Отбор образцов был произведен из трех индивидуальных локусов в пределах каждого из двух исследованных сайтов. Из образцов была выделена ДНК, проведена амплификация фрагментов генов 16S рРНК с помощью универсальных праймеров Univ806R и Univ515F, продукты амплификации секвенированы на платформе Illumina MiSeq. Фильтрацию по размеру и качеству фрагментов, а также дальнейшую обработку данных проводили с помощью программного пакета QIIME v. 1.8 (Caporaso et al., 2010). Таксономическую классификацию последовательностей осуществляли с использованием базы данных Silva19 (Pruesse et al., 2007; Quast et al., 2013).

В результате секвенирования было получено 1.2 млн. нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК средней длиной около 254 пар оснований. Пул последовательностей планктомицетов составил 128 172 фрагмента. Доля последовательностей планктомицетов в образцах варьировала в диапазоне 8-16%, что хорошо коррелирует с данными, полученными ранее при изучении сфагновых болот бореальной зоны России (Ivanova and Dedysh, 2012; Serkebaeva et al., 2013). В образцах торфа болота преобладали некультивируемые представители группы *Phycisphaera* WD2101, составляя до 51% общего пула последовательностей, тогда как в образцах почвы из ягельной лесотундры до 70% последовательностей принадлежали некультивируемым представителям семейства *Planctomycetaceae*. Планктомицеты групп *Isosphaera-Singulisphaera* (14-28%) и *Gemmata* (1-4%) присутствовали в образцах обеих исследованных экосистем.

При более детальном анализе данных секвенирования на уровне операционных таксономических единиц (ОТЕ), определенных со сходством 97%, что соответствует видовому уровню, было выявлено высокое разнообразие планктомицетов. Всего в исследованных образцах было идентифицировано 1 723 ОТЕ, что составляет 98-99% общего видового разнообразия планктомицетов в этих экосистемах. 342 ОТЕ были представлены как в болоте, так и лесотундре. Наиболее многочисленные из них принадлежали некультивируемым планктомицетам группы *Phycisphaera* WD2101 и семейства *Planctomycetaceae*. Также был выявлен ряд уникальных ОТЕ, характерных только для болота или почвы лесотундры. Количество уникальных ОТЕ, выявленных в торфе болота составило 357 штук (63 ОТЕ присутствовали в трёх локусах болота, 184 - в двух и 108 - в одном). Наиболее многочисленные из этих ОТЕ были представлены некультивируемыми планктомицетами группы *Phycisphaera* WD2101. Ближайшим таксономически описанным родственником этих бактерий является *Tepidisphaera mucosa* (85-89% сходства генов 16S рРНК). В почве лесотундры было выявлено 749 уникальных ОТЕ, (208 ОТЕ присутствовали в трёх локусах, 288 - в двух и 240 - в одном). Наиболее многочисленные из них были представлены некультивируемыми представителями семейства *Planctomycetaceae* и, в меньшей степени, представителями рода *Singulisphaera*. Филогенетический анализ ОТЕ, относящихся к некультивируемым представителям семейства *Planctomycetaceae*, выявил, что они образуют кластер, филогенетически удалённый от всех ныне описанных планктомицетов.

Таким образом, проведенный нами анализ выявил высокое разнообразие планктомицетов в двух наземных экосистемах, типичных для субарктической зоны России. Большинство полученных в результате анализа фрагментов генов 16S рРНК принадлежали неизученным планктомицетам, что свидетельствует о малой изученности микробных сообществ этих экосистем. Примечательно, что в торфяном болоте и почве ягельной лесотундры доминировали различные группы *Planctomycetes*. Это, в свою очередь, указывает на различие функциональных возможностей разных групп планктомицетов, большинство из которых до сих пор остаются неизученными.

## ПРОДУКЦИОННЫЕ И ДЕСТРУКЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ СОЛОНОВОДНЫХ РЕК ПРИЭЛЬТОНЬЯ

Канапацкий Т.А., Самылина О.С.

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

Озеро Эльтон является одним из крупнейших соляных водоемов Европы, располагается на территории бессточной Боткульско-Булухнинской опустыненной депрессии, входящей в состав Прикаспийской низменности. Благодаря процессам солянокупольной тектоники формируются высокоминерализованные подземные воды, которые поступают в почвы и питают реки, впадающие в озеро. Таким образом, реки Приэльтонья солоноводные: Хара, Ланцуг, Чернавка, Большая и Малая Сморогда, Солянка. При впадении рек в озеро Эльтон образуются обширные мелководья с низкой скоростью течения воды и повышенной солёностью благодаря смешению с рапой озера. Эти благоприятные условия способствуют массовому развитию бентосных альго-циано-бактериальных сообществ. Интенсивности микробных процессов в матах и осадках до настоящего времени не изучались. Таким образом, в задачу исследования входило получение первичных данных о продукционных и деструкционных процессах в циано-бактериальных матах и донных осадках солоноводных рек Приэльтонья по результатам работ, проводившихся в августе 2013, августе 2014 и мае 2015 гг (реки Хара, Ланцуг, Чернавка, Большая Сморогда, Солянка).

*Физико-химические характеристики вод* в исследуемые периоды.

Температура воды на станциях отбора проб варьировала от 24 до 32,5 °С и практически всегда была выше в устьях чем в средних участках. Значения рН варьировали от 7,3–7,9 (Солянка, Ланцуг, Чернавка) до 8–8,5 (Большая Сморогда, Хара, устье р. Ланцуг). Значения общей щелочности варьировали в диапазоне от 21,5 до 80 мг-экв/л, при этом уменьшаясь от среднего течения к устьевым участкам рек. Минерализация возрастала от истоков рек к устьевым участкам, где наибольшие значения были выявлены в р. Солянка и Чернавка (29-33 ‰), а наименьшие – в р. Ланцуг и Большая Сморогда (5-16 ‰).

*Физико-химические характеристики донных осадков* в исследуемые периоды.

Степень засоленности донных отложений в р. Солянка и Чернавка соответствовала солёности наддонной воды, тогда как в устьевых участках р. Ланцуг, Хара и Большая



Сморогда соленость осадков с углублением в толщу ила возрастала, превышая значения в воде в 2-5 раз.

Верхние горизонты осадков представляли собой окисленные желтовато-серые иллы, ниже которых располагаются сильно восстановленные осадки (Eh -210÷-450 мВ).

Общая щелочность поровых вод варьировала от 2,5 до 25,5 мг-экв/л. Характерной закономерностью являлось её снижение при углублении в толщу ила.

Содержание органического углерода ( $C_{\text{орг}}$ ) в осадках варьировало в широких пределах от 0,1 до 5,9% со средним показателем 0,76 % по массе.

В иловых водах на глубинах опробирования до 20 см были выявлены значительные содержания сульфатов (до 656 ммоль/дм<sup>3</sup> в устье р. Ланцуг). При этом в большинстве случаев максимальные значения по профилю достигались горизонте 5-10 см. С углублением опробирования осадка содержание сульфатов понижалось и становилось близко к величинам в горизонте 0-5 см.

Содержание метана в осадках рек изменялось от 2 до 1286 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Наибольшие величины (37-1286 мкмоль/дм<sup>3</sup>) выявлены в средних течениях р. Чернавка, Солянка, Ланцуг и устье р. Солянка, в тех биотопах, где выражено русло и алевропелитовый горизонт осадков. Наименьшие величины (2-64 мкмоль/дм<sup>3</sup>) отмечены в устьевых участках р. Чернавка, Ланцуг, Хара и Большая Сморогда, в зонах расширения русла, где отмечена высокая минерализация поровых вод осадков (от 27 до 144 ‰).

*Бентосные фототрофные сообщества и их первичная продукция (ПП).* В августе (2013-2014 гг.) дно исследованных биотопов в устьевых участках рек представляло собой полностью или частично покрытые циано-бактериальными матами и кожистыми плотными плёнками отложения черного ила. В мае (2015 г.) фототрофные сообщества занимали меньшие площади и были представлены, как правило, тонкими биоплёнками. Доминирующими формами в сообществах являлись нитчатые негетероцистные цианобактерии, способные, переплетаясь, образовывать биоплёнки различной прочности. Наиболее широко распространёнными видами были *Oscillatoria major*, *O. tenuis* и *Phormidium tambii*. Биомасса бентосных циано-бактериальных сообществ соленых рек Приэльтона варьировала в широком диапазоне от 20 до 903 мг хлф  $a/m^2$ . Значения ПП, измеренной во всей толще циано-бактериальной пленки на свету, также были разнообразными с величинами от 0,2 до 17,6 мг  $C/m^2 \cdot ч$ . Было показано, что способность к *аноксигенной фиксации*  $H^{14}CO_3^-$ , измеренная при добавлении ингибитора фотосистемы II диурона была довольно высокой в августе 2013 г. (62% от величины ПП) и 2014 г. (46,6%). В мае 2015 года доля аноксигенного фотосинтеза для большинства образцов составляла 6,7%.

Интенсивность *темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ)* в матах и донных осадках отражает суммарную гетеротрофную активность микробных сообществ. В августе 2013 и 2014 гг. величины ТАУ в матах варьировали в близких значениях: 0,5-0,8 и 0,4-1,9 мкмоль/дм<sup>3</sup>·сут, соответственно. В мае 2015 г. интенсивность ТАУ была невысокой как в матах (от 0,05 до 0,5 мкмоль/дм<sup>3</sup>·сут), так и в донных осадках (от 0,001 до 0,7 мкмоль/дм<sup>3</sup>·сут со средним показателем 0,076 мкмоль/дм<sup>3</sup>·сут).

Интенсивность процесса *сульфатредукции (СР)* в осадках измеряли в августе 2014 г. и мае 2015 г. В эти два сезона значения интенсивностей СР в большинстве случаев были сходны: 0,025-3,4 ммоль/(дм<sup>3</sup>·сут) в мае 2015 г. и 0,03-2 ммоль/(дм<sup>3</sup>·сут) в августе 2014 г.

В мае 2015 г в осадках была измерена интенсивность *гидрогенотрофного метаногенеза*. Значения скоростей этого процесса были низкими и варьировали от 0,001 до 0,66 нмоль/дм<sup>3</sup>·сут со средним показателем 0,09 нмоль/дм<sup>3</sup>·сут. Наименьшие интенсивности выявлены в осадках р. Солянка, Ланцуг и Чернавка – 0,001-0,02 нмоль/дм<sup>3</sup>·сут, а наибольшие – в верхних 10 см осадков р. Хара и Большая Сморогда – 0,017-0,66 нмоль/дм<sup>3</sup>·сут.

Интенсивность *окисления метана*, измеренная в осадках в мае 2015 г. была невелика и её значения соотносились с содержанием метана в осадках. Так, в более насыщенных метаном осадках окисление метана изменялось от 1,6 до 32,3 мкмоль/дм<sup>3</sup>, тогда как в менее насыщенных 0,01-0,33 мкмоль/дм<sup>3</sup>. Интегральные значения в 10 см слое донных осадков составили 1171-2235 и 2,8-20 мкмоль/м<sup>2</sup>, соответственно.

Таким образом, впервые получены данные об интенсивности продукционных и деструкционных процессов в микробных сообществах солоноводных рек Приэльтонья: Хары, Ланцуга, Чернавки, Большой Сморогды, и Солянки.

## **УСТОЙЧИВОСТЬ К МЕТАЛЛАМ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ NITROSPIRAE ИЗ ГЛУБИННОЙ БИОСФЕРЫ**

**Ю.А. Франк, К.М. Климова, А.П. Лукина, Н.С. Каланда, О.В. Карначук**

**Томский государственный университет, Томск, Россия**

Геохимическая роль сульфатредуцирующих прокариот связана с выведением металлов из круговорота за счет образования сульфидов с низкой растворимостью. Образование биогенных сульфидов железа, например, пирита, под действием сульфатредукторов имеет глобальное биогеохимическое значение. Показана также возможность осаждения в биогенные сульфиды двухвалентных металлов, отличных от

железа (Karnachuk et al., 2008; Ikkert et al., 2013). По аналогии с микроорганизмами на поверхности Земли, «глубинные» прокариоты способны катализировать множество реакций, влияющих на физико-химические характеристики воды и осадков (Lovely, Chapelle, 1995). Бактерии и археи глубинной биосферы являются агентами образования и растворения минералов, выветривания и перестройки горных пород; мобилизации и осаждения металлов; фракционирования изотопов (Ehrlich, 2002; Parnell et al., 2016). Несмотря на фундаментальную значимость, лишь единичные исследования представляют собой попытки изучения геохимической активности культивируемых микроорганизмов глубинной биосферы (Onstott et al., 2009; Reith, 2011). К настоящему моменту практически не исследована геохимическая деятельность сульфатредуцирующих прокариот в глубинных экосистемах суши, оставались без внимания процессы их взаимодействия с металлами и способность к минералообразованию.

Целью нашей работы является определение устойчивости к металлам для двух штаммов термофильных сульфатредуцирующих бактерий, выделенных из глубинных водоносных горизонтов в Томской области с различающимися гидрохимическими параметрами. Оба штамма принадлежат к роду *Thermodesulfovibrio* (Nitrospirae) и наиболее близкородственны с *T. aggregans* с 98-99% гомологией последовательности гена 16S рРНК (рис. 1).

Штамм N1 был выделен из воды глубинного водоносного горизонта (2.5 км), вскрытого скважиной 1-Р в Верхнекетском районе, а штамм V2 – из водоносного горизонта, вскрытого на глубине 2.1 км скважиной 5-Р в Колпашевском районе Томской области. Элементный анализ, выполненный методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), показал сравнительно невысокое содержание металлов в воде обеих скважин за исключением заметных концентраций мышьяка и стронция в воде скважины 5-Р (таблица 1). Высокое содержание стронция в воде этой скважины ранее обращало на себя внимание исследователей в связи с возможностью ее использования для лечебно-профилактических целей (Курортно-рекреационный потенциал ..., 2002).

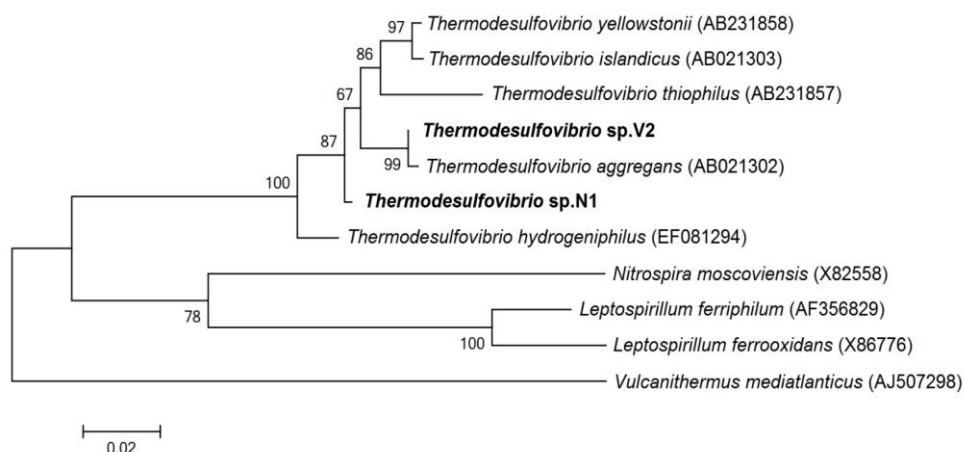


Рис. 1. Филогенетическое положение штаммов N1 и V2 на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК методом Maximum Likelihood. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

Для определения устойчивости к металлам и  $As^{3+}$  штаммы N1 и V2 культивировали на жидкой среде Видделя в оптимальных условиях (таблица 2). К среде добавляли водные растворы  $FeSO_4$ ,  $NiSO_4$ ,  $Sr(NO_3)_2$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CoSO_4$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $Na_3AsO_4$ . Рост фиксировали по появлению темного осадка и с помощью фазово-контрастной микроскопии. В каждом пассаже постепенно увеличивали концентрацию металлов.

Таблица 1. Содержание металлов и мышьяка в воде скважин 1-Р и 5-Р

Скважина	Концентрация металлов и мышьяка							
	Fe, мкг/л	Co, мкг/л	Ni, мкг/л	Zn, мкг/л	As, мкг/л	Mo, мкг/л	Cd, мкг/л	Sr, мг/л
1-Р	97	<0.02	0.1	<0.5	0.48	3.43	0.03	1.00
5-Р	940	0.91	14.0	<2.00	<b>29.5</b>	4.02	<0.10	<b>15.8</b>

*Thermodesulfovibrio* sp.N1 и V2 способны к росту в присутствии двухвалентных ионов металлов ( $Fe^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ ),  $Mo^{6+}$  и  $As^{3+}$  в гораздо более высоких концентрациях, чем в подземной воде, использованной для их выделения (таблица 2). Были определены предельные концентрации мышьяка (50 мг/л), железа (2 г/л), никеля (750 мг/л) и стронция (20 мг/л) для роста *Thermodesulfovibrio* sp.N1. Штамм V2 по сравнению со штаммом N1 гораздо более устойчив к ионам  $As^{3+}$  (в 4 раза) и особенно  $Sr^{2+}$

(в 12.5 раз). Наиболее вероятно, это связано с повышенным содержанием мышьяка и стронция в подземной воде скважины 5-Р.

Таблица 2. Концентрации металлов и мышьяка для роста штаммов *Thermodesulfovibrio*

Штамм / условия культивирования	Концентрация ионов металлов и мышьяка, мг/л					
	As <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Mo <sup>6+</sup>	Sr <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
N1, pH 8.5, 65 °C	50*	2000*	750*	30	20*	200
V2, pH 7.2, 65 °C	<b>200</b>	1600	150	40	<b>250</b>	150

\* - предельные концентрации

Таким образом, штаммы *Thermodesulfovibrio*, выделенные из глубинных водоносных горизонтов устойчивы к двухвалентным металлам и мышьяку. *Thermodesulfovibrio* sp.V2 является первой известной сульфатредуцирующей бактерией с высокой устойчивостью к ионам стронция. Концентрация Sr<sup>2+</sup> в 250 мг/л (2.8 mM) сопоставима с минимальными ингибирующими концентрациями (до 5 mM) для роста штаммов-продуцентов *Halomonas* spp., используемых в целях биоремедиации (Achal et al., 2012).

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 14-14-00427.

Литература:

1. Achal V., Pan X., Zhang D. (2012) Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based. *Chemosphere* 89: 764-768.
2. on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp
3. Ehrlich H.L. *Geomicrobiology* (4th edition): New York, Marcel Dekker, 2002. 768 p.
4. Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H. and Karnachuk O.V. (2013) Characterization of precipitates formed by H<sub>2</sub>S-producing, Cu-resistant Firmicute isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 1221–1234.
5. Karnachuk O.V., Sasaki K., Gerasimchuk A.L., Sukhanova O., Ivashenko D.A., Kaksonen A.H., Puhakka J.A., Tuovinen O.H. (2008) Precipitation of Cu-sulfides by copper-tolerant *Desulfovibrio* isolates. *Geomicrobiol J* 25:219–227.
6. Lovely D.R., Chapelle F.H. (1995) Deep subsurface microbial processes. *Reviews in Geophysics* 33: 365-381.

7. Onstott T. C., Colwell F. S., Kieft T. L., Murdoch L., and Phelps T. J. (2009) New horizons for deep subsurface microbiology. *Microbe* 4 (39): 499-505.
8. Parnell J., Brolly C., Spinks S., Bowden S. (2016) Metalliferous biosignatures for deep subsurface microbial activity. *Orig Life Evol Biosph* 46:107-118.
9. Reith F. (2011) Life in the deep subsurface. *Geology* 39: 287-288.
10. Курортно – рекреационный потенциал Западной Сибири / под ред. Е.Ф. Левицкого, В.Б. Адилова. Томск, Издательство «Красное знамя», 2002. С. 115-117.

## БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК НОВЫХ ЛАККАЗ У АКТИНОБАКТЕРИЙ

**А. И. Конев<sup>1</sup>, М. С. Куюкина<sup>1,2</sup>, И. Б. Ившина<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия.

<sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия.

Лакказы (КФ 1.10.3.2) – полифенольные оксидазы, катализирующие окисление разнообразных органических соединений. Поиск бактериальных лакказ актуален из-за их более высокой активности при повышенной температуре и щелочных условиях среды по сравнению с грибными ферментами. Актинобактерии рода *Rhodococcus* являются перспективными источниками новых ферментов для биотехнологии. Сравнительно недавно нами был секвенирован полный геном штамма *R. ruber* ИЭГМ 231, что позволило провести направленный поиск лакказных генов у родококков.

Цель работы – изучить генетическую организацию лакказ у родококков и оценить их внутривидовую гомологию. Задачи включали: (1) биоинформационный поиск лакказных генов в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 и других представителей родококков; (2) анализ структурных доменов выявленных последовательностей лакказ; (3) филогенетический анализ полимедных оксидаз; (4) оценку лакказной активности родококков. В работе использовали последовательности репрезентативных геномов представителей рода *Rhodococcus*, депонированных в открытых базах данных MicroScope (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>) и NCBI GenBank. Поиск вероятных лакказ осуществляли с использованием программы BLASTx. В качестве последовательности для выравнивания использовали модельную лакказу CotA из *Bacillus subtilis*, при этом отбирали выровненные последовательности с ожидаемым значением меньше нуля. Детальный анализ доменной структуры депонированных

последовательностей полимедных оксидаз родококков проводили с использованием алгоритма поиска консервативных доменов, реализованного в программе CD-search пакета BLAST. Филогенетический анализ полимедных оксидаз проводили путем множественных выравниваний аминокислотных последовательностей при помощи алгоритмов MUSCLE. После выравнивания последовательностей неоднозначные регионы удаляли при помощи редактора последовательностей в ПО Unipro UGENE (v1.22.0). Филогенетическое дерево построено с помощью метода максимального правдоподобия с использованием программы PhyML (v3.695), алгоритм aLRT. Степень доверия внутренним ветвям оценивали с помощью метода бутстрэп (на основании 100 сгенерированных выборок). Графическое представление филогенетического дерева реализовано с использованием ПО Unipro UGENE.

В результате анализа генома штамма *R. ruber* ИЭГМ 231 выявлено наличие мультигенного семейства лакказ, обнаружены два гена вероятных лакказ: RHRU231v1\_660030 и RHRU231v1\_620027, и четыре гена предполагаемых полимедных оксидаз: RHRU231v1\_470119, RHRU231v1\_850023, RHRU231v1\_480098 и RHRU231v1\_760007. Экспериментально подтверждена лакказная активность данного штамма в тесте с ABTS. Обнаружены следующие структурные домены полимедных оксидаз: RHRU231v1\_660030: CuRO\_1\_Tth-MCO\_like, CuRO\_3\_Tth-MCO\_like, Cupredoxin super family, SufI; RHRU231v1\_620027: CuRO\_1\_Tth-MCO\_like, CuRO\_3\_Tth-MCO\_like, Cupredoxin super family, SufI; RHRU231v1\_850023: CuRO\_3\_CopA, CuRO\_2\_CopA\_like\_1, CuRO\_1\_CumA\_like, SufI; RHRU231v1\_760007: CuRO\_1\_CumA\_like, CuRO\_3\_CopA, Cupredoxin super family, SufI; RHRU231v1\_470119: CuRO\_1\_CueO\_FtsP, CuRO\_2\_CueO\_FtsP, CuRO\_3\_CueO\_FtsP, ascorbOXfungal; RHRU231v1\_480098: YfiH. Биоинформационный анализ показал, что для других видов родококков характерно наличие полимедных оксидаз с аналогичной доменной структурой. Так, лакказные домены CuRO\_1\_Tth-MCO\_like и CuRO\_3\_Tth-MCO\_like обнаружены в последовательностях представителей *R. erythropolis*, *R. jostii*, *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. phenolicus*, *R. imtechensis* и *R. triatomae*. В геномах других видов родококков также обнаружены полимедные оксидазы и вероятные лакказоподобные белки. Анализ гомологии полимедных оксидаз из *R. ruber* ИЭГМ 231 и аналогичных последовательностей других видов родококков показал, что для RHRU231v1\_480098 и RHRU231v1\_760007 характерно наибольшее (71-85%) сходство. Менее выраженное сходство отмечено для последовательностей RHRU231v1\_470119 (47-66%) и RHRU231v1\_850023 (около 50%), а наиболее низкое (30-52%) – для RHRU231v1\_660030 и RHRU231v1\_620027.

Филогенетическое дерево (рисунок) выявило 4 кластера, при этом полимедные оксидазы, вошедшие в кластеры 1 и 2, имеют аналогичные домены с последовательностями RHRU231v1\_470119. Исходя из структуры доменов, это полимедные оксидазы, отвечающие за резистентность бактерий к ионам меди и участвующие в делении клетки. Кластер 3 сформирован полимедными оксидазами, имеющими сходные домены с RHRU231v1\_850023. Данные полимедные оксидазы выполняют различные клеточные функции и, возможно, также участвуют в формировании резистентности бактерий к ионам меди. В кластер 4 вошли полимедные оксидазы с доменной структурой, аналогичной RHRU231v1\_760007, и имеющие высокую степень сходства с последовательностями из кластера 3. Филогенетический анализ подтвердил обособленность последовательностей вероятных лакказ RHRU231v1\_620027; RHRU231v1\_660030 из *R. ruber* ИЭГМ 231, что свидетельствует об их возможной функциональной уникальности и более ранней эволюционной дивергенции.

Исследования выполнены в рамках Госзадания № 6.1194.2014/К Минобрнауки России и при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00643).



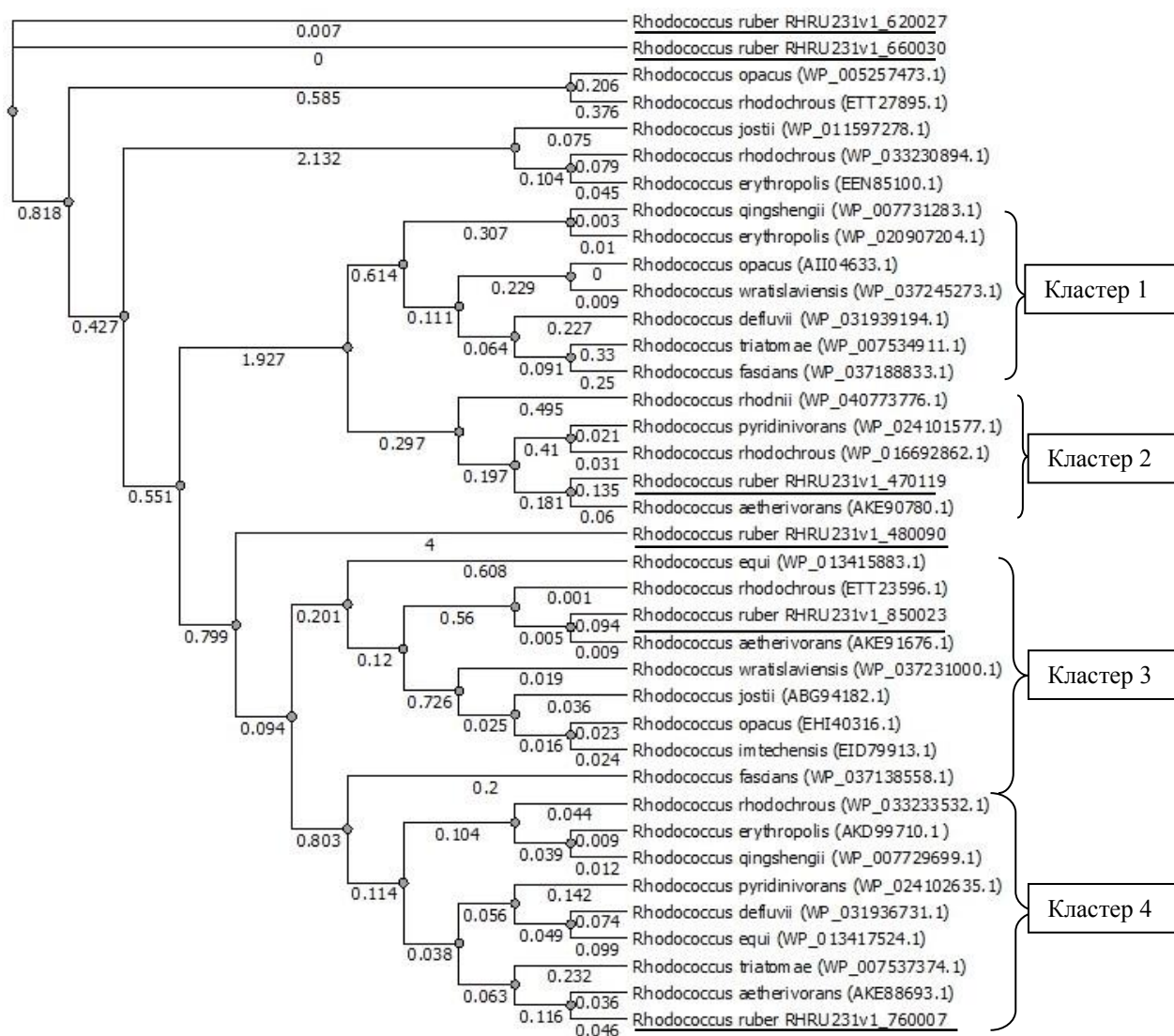


Рисунок. Кластеризация аминокислотных последовательностей полиметаллических оксидаз актинобактерий рода *Rhodococcus*.

**ОТ ЛИТОТРОФИИ ДО ГИДРОЛИЗА СЛОЖНЫХ ПОЛИМЕРОВ:  
МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ РОДА  
*THERMOFILUM***

**Т.В. Кочеткова<sup>1</sup>, О.А. Подсокорская<sup>1</sup>, А.В. Лебединский<sup>1</sup>, С.В. Тошаков<sup>2</sup>, И.В. Кубланов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

<sup>2</sup>Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта

Культивируемые представители Crenarchaeota составляют пять порядков, среди которых первым был описан порядок *Thermoproteales*, на данный момент являющийся

наиболее изученным. Семейство *Thermofilaceae* представляет глубокую ветвь внутри этого порядка и состоит из одного рода *Thermofilum*. На сегодняшний момент внутри рода валидно описаны два вида – *T. pendens* и *T. uzonense*, выделенные из горячих источников Исландии и Камчатки, соответственно (1, 2). Все представители – строгие анаэробы, гипертермофилы, растущие при нейтральном pH, гетеротрофы, разлагающие пептиды и полисахариды. Отличительной особенностью культивирования представителей рода *Thermofilum* является облигатная зависимость их роста от присутствия в среде полярных липидов *Thermoproteus tenax* или клеточных фильтратов других представителей Crenarchaeota. Это объясняется отсутствием в их геномах большого набора генов биосинтетических путей, таких как синтез пуринов, многих аминокислот и ко-факторов (2, 3).

Из горячих источников Камчатки были выделены и описаны два штамма гипертермофильных архей, 1910b и 1505, с нитевидной морфологией и 100% сходства последовательностей генов 16S рРНК. Филогенетический анализ генов 16S рРНК, *in silico* геном-геномная гибридизация и подсчет среднего нуклеотидного сходства (Average nucleotide identity ANI) между геномами новых штаммов и известных видов *Thermofilum* позволил отнести выделенные археи к новому виду рода *Thermofilum*, '*T. adornatus*', с типовым штаммом 1910b<sup>T</sup> (4). Новый вид отличается от ранее описанных способностью расти гетеротрофно на аморфной и микрокристаллической целлюлозе (штамм 1910b<sup>T</sup>) и литотрофно на окиси углерода (штамм 1505) с образованием водорода, согласно реакции  $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ . Такой тип преобразования CO используют гидрогеногенные карбоксидотрофы – филогенетически разнородная группа бактерий и архей, представленная, в основном, термофильными микроорганизмами (5). Геномный анализ выявил наличие кластера, включающего гены анаэробной (Ni-содержащей) СО-дегидрогеназы и генов преобразующей энергию гидрогеназы (CODH-ECH генный кластер) у штамма 1505. Подобный генный кластер был обнаружен во всех сиквенированных геномах гидрогеногенных карбоксидотрофов (6). '*Thermofilum adornatus*' 1505 – первый представитель фило Crenarchaeota, способный расти за счет энергии окисления оксида углерода. В то же время, в геноме целлюлолитического штамма 1910b не было обнаружено генов, кодирующих ферменты, способные разлагать целлюлозу. Более того, за исключением одного гена, предположительно, кодирующего альфа-амилазу, отсутствующего у штамма 1505, наборы остальных гликозидаз-кодирующих генов у двух штаммов оказались одинаковыми. Все это может указывать на наличие в геноме штамма 1910b генов, кодирующих новые целлюлазы.

Список литературы:

1. Zillig, W., Gierl, A., Schreiber, G., Wunderl, S., Janekovic, D., Stetter, K.O., Klenk, H.P. (1983). The archaeobacterium *Thermofilum pendens* represents, a novel genus of the thermophilic, anaerobic sulfur respiring *Thermoproteales*. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 79–87.
2. Toshchakov, S.V., Korzhenkov, A.A., Samarov, N.I., Mazunin, I.O., Mozhey, O.I., Shmyr, I.S., et al. (2015). Complete genome sequence of and proposal of *Thermofilum uzonense* sp. nov. a novel hyperthermophilic crenarchaeon and emended description of the genus *Thermofilum*. *Stand. Genom. Sci.* 10:122. doi: 10.1186/s40793-015-0105-y
3. Anderson, I., Rodriguez, J., Susanti, D., Porat, I., Reich, C., Ulrich, L.E., et al. (2008). Genome sequence of *Thermofilum pendens* reveals an exceptional loss of biosynthetic pathways without genome reduction. *J. Bacteriol.* 190, 2957–2965.
4. Dominova, I.N., Kublanov, I.V., Podosokorskaya, O.A., Derbikova, K.S., Patrushev, M.V., Toshchakov, S.V. (2013). Complete genomic sequence of “*Thermofilum adornatus*” strain 1910b<sup>T</sup>, a hyperthermophilic anaerobic organotrophic crenarchaeon. *Genome Announc.* 1:5. e00726-13
5. Diender, M., Stams, A.J.M., and Sousa, D.Z. (2015). Pathways and bioenergetics of anaerobic carbon monoxide fermentation. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01275
6. Sant'Anna, F.H., Lebedinsky, A.V., Sokolova, T.G., Robb, F.T., Gonzalez, J.M. (2015). Analysis of three genomes within the thermophilic bacterial species *Caldanaerobacter subterraneus* with a focus on carbon monoxide dehydrogenase evolution and hydrolase diversity. *BMC Genomics.* 7;16(1):757. doi: 10.1186/s12864-015-1955-9

**РАЗНООБРАЗИЕ МИКОБИОТЫ АРИДНЫХ ПОЧВ КАК ОБЪЕКТ  
ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ ЭУКАРИОТНЫХ  
СООБЩЕСТВ В МОДЕЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ МАРСА**

**Крючкова М.О.<sup>1</sup>, Иванова А.Е.<sup>1</sup>, Воробьева Е.А.<sup>1,4</sup>, Чепцов В.С.<sup>1</sup>, Павлов А.К.<sup>2</sup>,  
Ломасов В.Н.<sup>3</sup>**

**<sup>1</sup> факультет почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия; <sup>2</sup> ФТИ РАН  
им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия; <sup>3</sup> СПбГПУ Петра Великого, Санкт-  
Петербург, Россия; <sup>4</sup> ИКИ РАН, г. Москва, Россия**

margo\_kruchkova@mail.ru

В почвах пустынь существует большое разнообразие микроскопических грибов. Тот факт, что формирование грибных сообществ происходило в экстремальных ксерофитных условиях, подразумевающих также повышенную засоленность, позволяет предположить, что развивающиеся в таких экотопах микромицеты обладают механизмами устойчивости к множественному воздействию неблагоприятным факторов. Могут ли эукариоты длительно сохранять жизнеспособность в инопланетных условиях – один из важнейших вопросов астробиологии. Целью данного исследования был анализ изменения разнообразия микобиоты пустынных почв в результате комплексного воздействия ионизирующей радиации, низкой температуры и низкого давления, имитирующих условия реголита Марса с учетом накопления дозы радиации за геологическое время.

Объектами исследования послужили образцы верхних гумусовых горизонтов пустынных почв: серозема (пустыня Негев, Израиль, Aridic Calcisols) и серо-коричневой (горная пустыня Марокко, Xerosols).

Моделирование условий осуществили с помощью оригинальной климатической камеры (Pavlov et al., 2010), созданной на базе ФТИ им. А.Ф. Иоффе (Санкт-Петербург) и гамма-установки с источником  $Co^{60}$ . Облучение проводили при температуре  $-50^{\circ}C$  и давлении в 1 торр. Образец серозема получил суммарную дозу 10 Мрад, а образец серо-коричневой почвы - 100 Мрад. Перед облучением образцы активировали увлажнением и инкубировали 10 суток при  $28^{\circ}C$ , затем высушивали до воздушно-сухого состояния. После облучения образцы хранили при  $-18^{\circ}C$ . Далее проводили сравнительный анализ состава сообществ культивируемых микроскопических грибов и разнообразия грибных структур в составе грибной биомассы в облученных и исходных образцах почв.

Для выделения грибов использовали метод посева почвенных суспензий, предварительно прогретых (52°C, 2 мин, Кочкина и др., 2001) с целью активизации спор и повышения выявляемого разнообразия микромицетов. Посевы осуществляли на твердые питательные среды – Чапека (Методы..., 1991) и щелочной агар (Биланенко, Георгиева, 2005). Содержание биомассы грибов и ее биоморфологическую структуру оценивали методом прямой люминесцентной микроскопии при окрашивании калькофлюором белым и акридином оранжевым (Методы..., 1991). Численность грибных пропагул в исходных образцах пустынных почв достигала 10-100 тыс. КОЕ/г. В серо-коричневой горной пустынной почве была установлена более высокая численность и повышенное суммарное видовое разнообразие микромицетов по сравнению с сероземом.

Облучение дозой 10 Мрад оказало стимулирующее воздействие на микобиоту серозема: отмечено возрастание на два порядка численности жизнеспособных грибных колониеобразующих единиц (КОЕ), увеличение в 1,5 раза выявляемого видового разнообразия грибов, возрастание содержания биомассы грибных спор и мицелия.

При облучении серо-коричневой почвы 10-кратно более высокой дозой в 100 Мрад происходило снижение содержания грибной биомассы в 1,5-2 раза, сокращение разнообразия культивируемых грибных сообществ, подавление роста многих видов грибов. Важно отметить, что эта доза облучения, ранее не исследованная на живых организмах, не приводила к полной гибели эукариот – микромицетов. В облученных образцах в структуре грибных сообществ отмечены значительные изменения: в доминирующей позиции оказались несколько видов, которые в исходных образцах были либо типичными, но не доминирующими, либо редкими. Число КОЕ этих видов после облучения, как правило, резко возрастала. Как наиболее устойчивые виды, доминирующие после облучения, выделялись представители рода *Aspergillus*: *Aspergillus fumigates* и *A. niger*.

Интересно отметить, что после облучения также регистрировали развитие ряда видов грибов, не встречавшихся в исходных образцах: *Emericella nidulans*, *Geomyces pannorum*, *Phialophora fastigiata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, некоторые виды родов *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*.

Таким образом, установлено, что в условиях имитирующих реголит Марса вне доступности ультрафиолета: воздействию ионизирующего излучения (гамма-радиации) низкой температуры и низкого давления, - жизнеспособность организмов, подобных ксерофитоустойчивым эукариотам-микромицетам может сохраняться миллионы лет при

накоплении дозы радиации до 100 Мрад и более. Выявленные признаки активизации грибных сообществ в моделируемых условиях ставят вопрос для исследования возможности их метаболической активности *in situ* в грунте Марса.

Список источников:

1. Биланенко Е.Н. Георгиева М.Л. Микробиоты солончаков Южной Сибири (Кулундинская степь) // Микология и фитопатология. 2005. Т.39. Вып.4. 6–13.
2. Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Карасев С.Г. и др. Выживание микробиоты и актинобактерий в условиях длительной природной криоконсервации // Микробиология. 2001. Т. 70. № 3. С. 412-420.
3. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. Пособие / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с
4. Pavlov et al. // International Journal of Astrobiology, 2010. 9 (1): 51–58

## **ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ**

**Е. П. Ветчинкина<sup>1</sup>, М. А. Купряшина<sup>1</sup>, В. Ю. Горшков<sup>2</sup>, Ю. В. Гоголев<sup>2</sup>, В. Е. Никитина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

Ксилотрофные базидиомицеты занимают важное место в структуре растительных и лесных биоценозов, как участники процессов биодеструкции растительных отходов, поскольку одними из ключевых ферментов для дереворазрушающих грибов являются фенолоксидазы. Представители данной группы базидиомицетов *Lentinus edodes* (шиитаке), *Grifola frondosa* (маитаке) и *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный) относятся к грибам белой гнили, способным разлагать все компоненты древесины и использовать продукты расщепления фенольных соединений в качестве пищевых субстратов. Однако, есть предположение, что ферменты лакказы и тирозиназы могут также принимать участие в морфообразовании грибов.

В связи с этим, мы предприняли исследование динамики транскрипционной активности генов *lcc1*, *lcc2*, *lcc3* и *tyr1*, *tyr2*, кодирующих ферменты лакказы и тирозиназы, на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов.

В соответствии с общепринятыми критериями и алгоритмами были сконструированы специфичные праймеры и флуоресцентные зонды для количественного ПЦР-анализа обратных транскриптов выбранных генов. Задача осложнилась тем, что информация о последовательности геномов наших объектов исследования в базах данных крайне ограничена. В ряде случаев недостаток этой информации удавалось восполнить построением консенсусных последовательностей кодирующих областей генов с использованием базы данных по другим видам базидиомицетов.

В процессе развития исследуемые ксилотрофные макромицеты последовательно образуют характерные и хорошо дифференцированные морфоструктуры: непигментированный мицелий (НМ), мицелиальную пленку (МП) – очень плотную сильно пигментированную структуру, образование которой предшествует плодоношению, примордии (ПР) и плодовые тела (ПТ). На данных этапах развития базидиомицетов мы проследили изменение уровня экспрессии интересующих нас генов.

Уровень экспрессии генов лакказы (*lcc1*, *lcc2* и *lcc3*) существенно зависел от конкретной стадии морфогенеза грибов и заметно повышался на стадиях мицелиальной пленки и примордиев, где экспрессия была максимальной (Рис. 1).

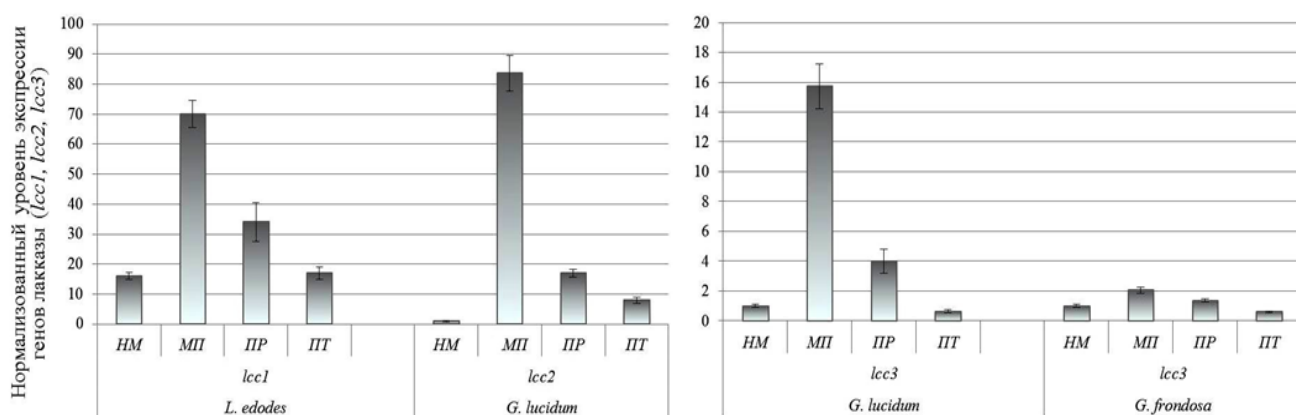
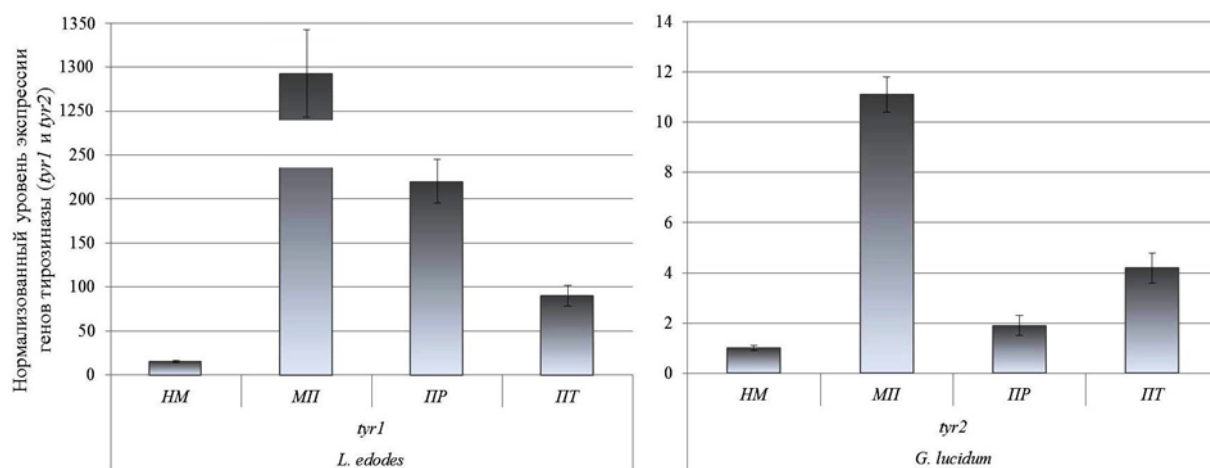


Рис. 1 Уровень экспрессии генов лакказы (*lcc1*, *lcc2* и *lcc3*) на разных стадиях морфогенеза *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa*. Данные нормализованы по транскрипционной активности гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpd*)

Экспрессия генов тирозиназы (*tyr1* и *tyr2*) возрастала по мере пигментирования мицелия, и самый высокий уровень экспрессии отмечен на стадии мицелиальной пленки – сильно пигментированной морфоструктуры базидиомицетов (Рис. 2).



**Рис. 2** Уровень экспрессии генов тирозиназы (*tyr1* и *tyr2*) на разных стадиях морфогенеза *L. edodes* и *G. lucidum*. Данные нормализованы по транскрипционной активности гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpd*)

Динамика активности лакказы и тирозиназы коррелировала с результатами ПЦР-анализа. По мере пигментирования мицелия, активность ферментов повышалась, и максимум активности приходился на время образования мицелиальной пленки и базидиом. Также с помощью нативного электрофореза и специфической окраски мы установили (на примере *L. edodes*), что на протяжении жизненного цикла макромицета в составе фенолоксидазного комплекса наблюдаются заметные различия. На стадии мицелиальной пленки и в базидиомах появлялись лакказы и тирозиназы не обнаруженные в непигментированном мицелии.

Полученные данные можно объяснить участием фенолоксидаз в синтезе меланина, который играет важную роль в устойчивости грибов к окружающим условиям. Повышенная концентрация пигментов отмечается в плотных структурах, которые в неблагоприятных условиях окружающей среды могут выполнять защитную функцию в начале формирования плодового тела. Считается, что образование меланина обеспечивает резистентность к ультрафиолету и излучению видимого света. Кроме того, присутствие данного пигмента оказывает сильное влияние на устойчивость хитин-меланинового комплекса к действию хитиназы и 1,3-β-глюканазы. Пигменты могут располагаться либо в виде отдельных гранул на внешней поверхности гиф, либо внутри клеточной стенки, образуя комплекс с хитином, в результате чего возникает наружный барьер, обладающей устойчивостью к ферментам патогенов. Кроме того, они необходимы при скреплении компонентов клеточных стенок при формировании морфогенных структур.



Таким образом, переход от вегетативной стадии развития к образованию базидиом сопровождается повышением активности лакказы и тирозиназы, а также перестройкой в составе оксидазного комплекса, тесно связано с образованием внеклеточных пигментов и идет параллельно окислительной полимеризации компонентов клеточной оболочки, усиливающих межклеточную спайку. Полученные результаты указывают на разнообразие процессов, в которых данные ферменты принимают участие. Фенолоксидазы, необходимые ксилотрофам для разрушения древесины и обеспечения себя питательными веществами, принимают, кроме того, участие в морфообразовании грибов, катализируют синтез меланинов, выполняющих защитную функцию, особенно перед началом плодоношения, а также необходимы при скреплении и агрегации мицелия для формирования базидиом макромицетов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-02926\_А.

## **БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ**

**М. А. Купряшина, Е. П. Ветчинкина, Е. А. Лощинина, А. М. Буров. В. Е. Никитина**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Известно, что многие микроорганизмы, в частности водоросли, бактерии и грибы способны участвовать в биосинтезе наночастиц благородных металлов. Несмотря на активные исследования последнего десятилетия, вопрос о механизме биосинтеза наносеребра и нанозолота до сих пор открыт. Наше внимание привлекло предположение о возможном участии фенолоксидаз в биоредукции золота с образованием наночастиц. Первые свидетельства биообразования наночастиц касаются микроорганизмов, чье место обитание связано с повышенным содержанием металлов. Так для *Pseudomonas stutzeri* – бактерии серебряных рудников – была показана способность к образованию наночастиц серебра, однако в последствии установлено, что данная псевдомонада участвует и в биосинтезе наночастиц золота. Способность почвенных микроорганизмов выживать при высоких концентрациях ионов металлов зависит от конкретных механизмов резистентности, таких как наличие эффлюксных систем, инактивации металлов через комплексообразование, непроницаемости клеточной стенки, а также изменением

токсичности с помощью биоредукции. Мы предполагаем, что подобное свойство к биоредукции токсичных соединений металлов с образованием наночастиц, может быть универсально. Основываясь на вышеизложенном, а также учитывая, что почвенные бактерий рода *Azospirillum* и почвенные базидиомицеты рода *Agaricus* продуцируют пул фенолоксиляющих ферментов, включая Mn-пероксидазы, лигнин-пероксидазы, лакказы и тирозиназы, было предпринято сравнительное исследование биообразования наночастиц золота и серебра данными микроорганизмами.

В ходе нашей работы установлено, что через 48 ч культивирования *Azospirillum brasilense* Sp245 в присутствии  $\text{AgNO}_3$  в концентрации 1 мМ, среда выращивания приобретала желтое окрашивание, которое с течением времени (72 ч) становилось интенсивнее. В опытных образцах, содержащих  $\text{HAuCl}_4$  в конечной концентрации 30 мкМ, среда культивирования начинала приобретать слабое сиреневое окрашивание также на вторые сутки культивирования. В тоже время, при культивировании *Agaricus bisporus* на жидкой синтетической среде добавление в среду выращивания золотохлористоводородной кислоты в аналогичной концентрации уже спустя 24 ч приводило к сиреневому или красному окрашиванию грибных гиф, а также культуральной жидкости. При внесении в среду ионов серебра цвет культуральной жидкости, а также гиф макромицета, заметно темнел начиная со вторых суток выращивания. По данным литературы, подобное изменения окраски среды и биообъектов при культивировании с золото- и серебросодержащими соединениями свидетельствует о накоплении наночастиц.

По данным просвечивающей электронной микроскопии синтезированные наночастицы серебра, в присутствии азоспирилл, в основной массе представлены наносферами размером от 10 до 80 нм, в отличие от морфологически гетерогенных наночастиц золота (наносферы, треугольники и пятиугольники) размером от 20 до 100 нм и наноконгломераты до 300 нм. В противоположность, состав наночастицы золота, синтезированных при культивировании *A. bisporus* с внесение 30 мкМ  $\text{HAuCl}_4$ , был гомогенен как по размеру, так и по форме. При этом нами отмечалось образование наночастиц размером от 2 до 6 нм (Рис.1А). При внесении нитрата серебра, в культуральной жидкости *A. bisporus* и на поверхности грибных гиф в опытных образцах, наблюдались электронно-плотные образования сферической формы, при этом размер частиц варьировал от 5 до 30 нм (Рис.1Б).

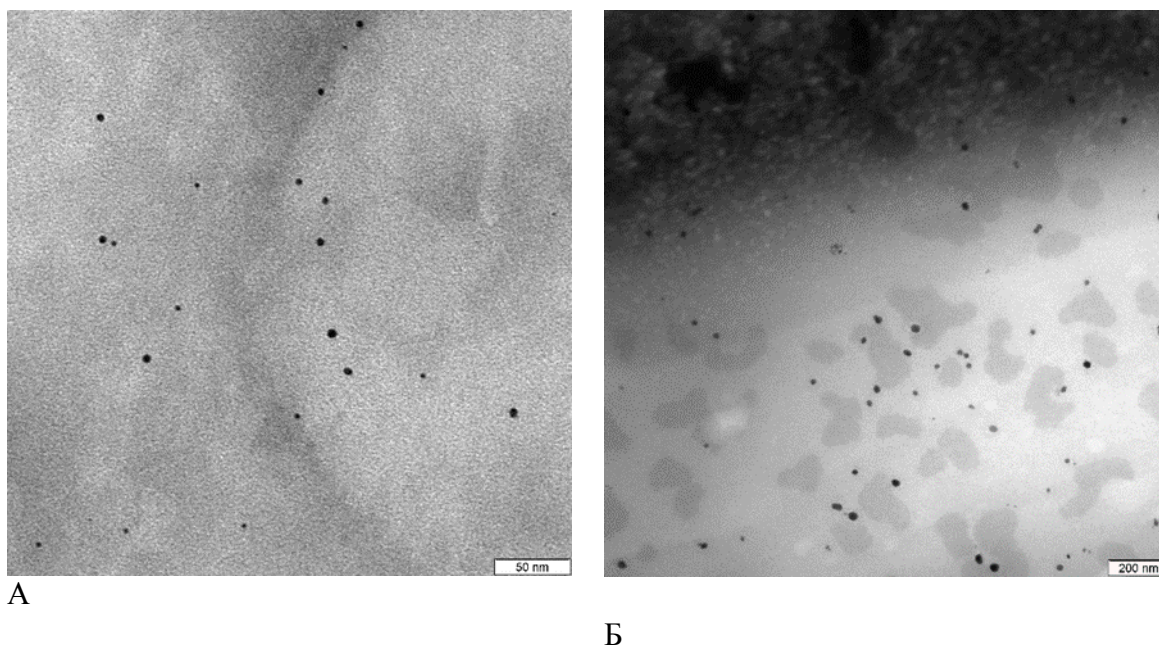


Рис. 1 Просвечивающая электронная микроскопия наночастиц золота (А) и серебра (Б), биосинтезированных в присутствии *A. bisporus*

Размер биологически синтезированных частиц металлов был также оценен методом динамического светорассеяния. Полученные результаты по размеру наночастиц подтвердили данные электронной микроскопии. Дзета-потенциал коллоидного золота, синтезированного с помощью шампиньона, составлял от  $-18$  до  $-25$  mV, наночастиц серебра от  $10$  до  $-15$  mV. Дзета-потенциал золотых и серебряных коллоидных растворов, образовавшихся в присутствии азоспирилл был от  $-8$  до  $-15$  mV, однако коллоиды были стабильным и в течении длительного времени агрегации частиц не происходило.

Содержание серебра и золота в отфильтрованных суспензиях наночастиц определяли с помощью рентгенофлуоресцентного анализа по характерным эмиссионным линиям. Для определения степеней окисления биологически восстановленных элементов, содержащихся в суспензиях наночастиц, использовали метод рентгенофазового анализа на дифрактометре ДРОН-3.0. Металлы восстанавливались до нулевой степени окисления полностью, и сигналов от исходных соединений  $\text{HAuCl}_4$  и  $\text{AgNO}_3$  обнаружено не было.

Таким образом, в ходе проведенного исследования, получены приоритетные данные о способности *A. bisporus* и *A. brasilense* к биосинтезу золотых и серебряных наночастиц. Интересным представляется тот факт, что в отличие от *A. bisporus* образование наночастиц в присутствии *A. brasilense* происходило в основном внеклеточно. В ходе данной работы с помощью биологического метода синтеза получены сверхмалые наночастицы золота от  $2$  до  $6$  нм. Полученные данные несомненно имеют весомую

научно-практическую значимость, так как одним из интенсивно развивающихся направлений в области нанотехнологий является исследование свойств и разработка вариантов синтеза золотых и серебряных наночастиц с заданными размерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-01200 мол\_а).

## **ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

**А. А. Мельникова<sup>1</sup>, А. В. Комова<sup>1</sup>, Р. Г. Васильев<sup>1,2</sup>, Д. Д. Цыренова<sup>3</sup>, В. Б. Дамбаев<sup>3</sup>,  
О. П. Дагурова<sup>3</sup>, Д. Д. Бархутова<sup>3</sup>, М. А. Петрушкина<sup>4,5</sup>, Д. В. Кузьмин<sup>4</sup>, В. А.  
Винокуров<sup>5</sup>, Х. М. Кадиев<sup>6</sup>, А. В. Волков<sup>6</sup>, А. У. Дандаев<sup>6</sup>, З. Б. Намсараев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

<sup>2</sup>Технологическая платформа "Биоэнергетика", Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Республика  
Бурятия, Россия

<sup>4</sup>ООО «Соликсент»

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО Российский государственный университет нефти и газа (НИУ) им. И.М.  
Губкина, Москва, Россия

<sup>6</sup>ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им.  
А.В. Топчиева РАН

Одним из наиболее ярких примеров процесса эвтрофикации водоемов в России является массовое развитие водорослей в озере Байкал, ранее считавшемся одним из чистейших озер планеты. Озеро Байкал является объектом Всемирного наследия ЮНЕСКО и вмещает в себя 20% мировых запасов пресных вод. С 2006 по 2014 год объем сточных вод, сбрасываемых в Байкал, увеличился почти на 40%, с 319 куб. км до 446 куб. км. Начиная с 2011 года, в озере происходит массовое развитие нитчатой водоросли *Spirogyra*, при этом масса выброшенной *Spirogyra* в

районе города Северобайкальск составила 1800 тонн на берегу протяженностью 10 км. Летом 2016 года содержание хлорофилла в открытой части озера Байкал увеличилось до такого уровня, что достигло верхнего предела чувствительности дистанционного зонда MODIS спутника Terra, а вода во многих заливах приобрела насыщенно зеленый цвет.

Целью данной работы является изучение видового состава и оценка возможности получения биотоплива из водорослей прибрежной зоны озера Байкал. В августе-сентябре 2016 года были отобраны пробы воды и биомассы микроводорослей из прибрежной зоны озера Байкал. Пробы были отобраны в центральной и южной части озера Байкал, в Республике Бурятия: Baikal-1 - проба воды ярко-зеленого цвета из Баргузинского залива; Baikal-2 - биомасса водорослей рядом с поселком Выдрино; Baikal-3 и Baikal-5 – проба воды, отобранная рядом с мысом Безымянный, Прибайкальский район; Baikal-4 - проба воды, отобранная рядом с поселком Энхэлук, Кабанский район; Baikal-6 - биомасса водорослей и высшей водной растительности на берегу залива Провал, Кабанский район. При отборе пробы Baikal-6 была проведена количественная оценка массы водорослей выброшенных на берег озера. Ширина скоплений биомассы составила около 1 метра, толщина около 30 см. Масса водорослей составляла 412.5 тонн влажной биомассы или 25.4 тонн сухой биомассы на 1 км береговой линии.

Изучение образцов с использованием оптической микроскопии показало, что в образцах Baikal-1 и Baikal-5 доминирует нитчатая гетероцистная цианобактерия рода *Anabaena* с изогнутыми трихомами, субдоминантом является нитчатая гетероцистная цианобактерия рода *Gloeotrichia*. В образце Baikal-2 доминирует *Spirogyra* – нитчатая водоросль с характерными спирально расположенными хлоропластами вдоль клеток. В образце Baikal-3 доминирует нитчатая гетероцистная цианобактерия рода *Anabaena* с изогнутыми трихомами, также присутствуют нитчатые цианобактерии рода *Pseudoanabaena*. В образце Baikal-4 доминируют водоросль *Spirogyra* и *Elodea* – многолетняя водная трава семейства Водокрасовые. В образце Baikal-6 доминируют представители родов *Elodea* и *Potamogeton* - многолетних водных растений семейства Рдестовые. Максимальная концентрация хлорофилла *a* в образцах составила 41.7 г/м<sup>3</sup> в образце Baikal-1.

На лабораторном стенде с автоклавным реактором исследовали гидроконверсию биомассы водорослей и биомассы водорослей в смеси с различным количеством тяжелых нефтяных остатков, содержащих полициклические гидроароматические компоненты и

длинноцепочные полимеры, с применением наноразмерных частиц катализатора с получением биотоплива и полупродуктов основного органического синтеза. Установлено, что увеличение доли водорослей в сырьевой смеси гидроконверсии оказывает влияние на структуру продуктов гидроконверсии: при повышении содержания водорослей в смеси с 10% до 20% увеличивается выход фракции 180°С с 15.9 до 18.3%, при этом снижается выход фракции НК-350°С с 37.2 до 30.3 %, выход вакуумного газойля увеличивается с 20.9 до 27.6%.

При увеличении концентрации водорослей в смеси до 50% выход бензиновой фракции увеличивается, а выход фракции 180-350°С уменьшается с 30.3 до 23.7%, выход вакуумного газойля с 27.6 до 19.6%. Исследование остатка выше 500°С показывает, что при увеличении концентрации водорослей уменьшается соотношение Н/С и растет доля нерастворимых в толуоле веществ, количество растворимых уменьшается. При гидроконверсии чистых водорослей наблюдается повышенный выход бензиновой фракции 27%, выход дизельного топлива 10%, вакуумного газойля 14.1%, при этом остается непревращенный остаток 48.8%. Следовательно, изменение концентрации водорослей в смеси с тяжелым нефтяным остатком в значительной степени влияет на фракционный состав продуктов гидроконверсии.

Конечный выход моторного топлива, полученного путем термокаталитической переработки биомассы водорослей из озера Байкал, составил 229 г из 1 кг сухой биомассы, в том числе 167 г бензина и 62 г дизтоплива. В расчете на 1 км береговой линии теоретический выход моторного топлива составляет 5.82 тонны исходя из количества сухой биомассы водорослей 25.4 тонны на 1 км берега. Таким образом, биомасса водорослей из прибрежной зоны озера Байкал может являться перспективным источником сырья для получения биотоплива при помощи термокаталитической переработки.

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АРХЕЙ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ КАМЧАТКИ

А.Ю. Меркель<sup>1</sup>, И.Ю. Тарновецкий<sup>1,2</sup>, А.А. Первалова<sup>1</sup>, Е.А. Бонч-Осмоловская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.

Ломоносова

Полуостров Камчатка является одним из самых больших районов современной вулканической активности на Земле, в котором сосредоточено более трехсот вулканов и множество термальных полей с горячими источниками, гейзерами, грязевыми вулканами и другими проявлениями поствулканической активности. Эти экосистемы являются естественной средой обитания термофильных прокариот, многие из которых были впервые изолированы из камчатских горячих источников. Помимо культуральных методов широкое применение в изучении термофильных прокариот на сегодняшний день получили молекулярные подходы. Особенно значительных успехов использование этих подходов позволило достичь в развитии наших представлений о разнообразии, распространенности и экологической значимости термофильных архей. Только за последние два-три года исследователями было предложено несколько новых филумов архей: *Pacearchaeota*, *Woesearchaeota*, *Lokiarchaeota*, *Bathyarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Aenigmarchaeota* и т.д.

Целью нашей работы была оценка разнообразия и распространенности архей в микробных сообществах горячих источников Камчатки в свете новых данных о филогении этих микроорганизмов с использованием современных методов молекулярной экологии. Мы проанализировали 17 горячих источников с диапазоном температур от 46 до 90 °С и значений рН от 3,1 до 7,2, используя в качестве объекта тотальную ДНК микробных сообществ и метод высокопроизводительного секвенирования V3-V4 гипервариабельных участков гена 16S рРНК. Для этой работы нами были модифицированы праймеры, фланкирующие эти участки, с целью избежать элиминирования из анализа глубоких филогенетических групп архей, которые не амплифицируются большинством опубликованных универсальных систем праймеров. В результате нами было получено более 2,5 миллионов последовательностей участков гена 16S рРНК и более 1,1 миллиона этих последовательностей в ходе биоинформатического анализа были отнесены к последовательностям архей. В микробных сообществах разных источников археи составляли от 0,8% до 97% популяции, при этом относительно высокое

содержание архей в микробных сообществах было выявлено в источниках как с умеренной температурой (от 54 °С), так и с температурой, близкой к температуре кипения. Было установлено, что археи доминируют в пяти источниках из 17-ти и большинство источников с доминированием архей имеют умеренную температуру (54-72 °С). Наиболее массовыми археями в исследованных источниках оказались представители филумов *Nanoarchaeota*, *Bathyarchaeota*, родов «*Caldiarchaеum*», *Vulcanisaeta*, *Fervidicoccus*, *Caldisphaera*, *Thermoproteus*, «*Nitrosocaldus*», филогенетических кластеров A10 (*Thermoplasmatales*), Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal group (TMEG), Terrestrial Miscellaneous Crenarchaeotal group (TMCG), BSLdp215 (*Thermoplasmatales*). Наше особое внимание привлекли к себе две группы архей в связи с их высокой численностью во многих источниках: это представители филума *Nanoarchaeota* и филогенетического кластера A10.

Кластер A10 представляет собой отдельное ответвление внутри семейства *Thermoplasmatales*, представители которого оказались по полученным данным массово представлены в целом ряде источников (насчитывали до 52% всех прокариот в отдельных источниках). При анализе корреляции температур и значений pH источников и относительной численности этой группы установлено, что представители кластера A10 тяготеют к умеренно термофильным условиям и к значениям pH ниже 6,5. При анализе уже опубликованных в различных базах данных последовательностей гена 16S рНК этой группы и мест их обнаружения было выявлено, что представители кластера A10 - выраженные эндемики наземных гидротерм со значениями pH в кислой зоне. Наноархеи также оказались на удивление широко представлены в микробных сообществах горячих источников Камчатки, в которых их относительная численность достигала 51% от всех прокариот. При анализе корреляции температур и значений pH источников и относительной численности этой группы установлено, что наноархеи тяготеют к высоким температурам (72 °С и выше), а также к кислым значениям pH. Полученные данные открывают широкие перспективы не только для целенаправленной культуральной работы, но также свидетельствуют о возможности проведения метагеномного секвенирования с целью частичной сборки геномов представителей мажорных групп архей в микробных сообществах горячих источников Камчатки.



# МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДОВ *TETRACYSTIS* И *SPONGIOCOCCUM* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

**С. В. Москаленко, А. Д. Темралеева**

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино,  
Россия

Почвенные зеленые водоросли являются сложным объектом для идентификации, так как обладают микроскопическими размерами и небольшим набором морфологических признаков, которые могут зависеть от параметров окружающей среды и условий культивирования (Margalef, 1955; Trainor, 1991; Trainor, Egan 1991; Luo et al., 2006, 2010; George et al., 2014). Тем не менее, морфологическая изменчивость данной группы микроорганизмов не только в естественных местообитаниях, но и в условиях лабораторного эксперимента слабо изучена, что создает значительные трудности при таксономическом определении и приводит к ошибочным диагнозам. В связи с этим **целью** данной работы являлось изучение морфологической изменчивости штаммов зеленых водорослей родов *Tetracystis* и *Spongiococcum* (Chlorophyta) в зависимости от состава и плотности питательной среды, а также длительности культивирования.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования стали зеленые водоросли из альгологической коллекции ИФХиБПП РАН ACSSI (<http://acssi.org>): 6 аутентичных штаммов из рода *Tetracystis* (*T. aplanospora* (Arce et Bold) Brown et Bold – ACSSI 225, *T. illinoisensis* Brown et Bold – ACSSI 227, *T. intermedia* (Deason et Bold) Brown et Bold – ACSSI 228, *T. isobilateralis* Brown et Bold – ACSSI 229, *T. pampae* Brown et Bold – ACSSI 230, *T. vinatzeri* Ettl et Gärtner – ACSSI 233) и 1 аутентичный штамм из рода *Spongiococcum* (*S. tetrasporum* Deason – ACSSI 222). Все водоросли характеризуются сарциноидной организацией таллома за счет особого вегетативного размножения – десмосхизиса, наличием одного хлоропласта и пиреноида. Представители рода *Tetracystis* имеют пристенный тип хлоропласта, в отличие от рода *Spongiococcum* с центральным типом (Андреева, 1998). Штаммы культивировали на твердых питательных средах Bristol и Bold 3N с содержанием агара 1 и 2% (Темралеева и др., 2014) при температуре +25 °С, освещенности 2000 Лк и 12-часовом световом режиме. Среда Bold 3N является более богатой питательной средой по сравнению со средой Bristol, т.к. в ней содержится тройная концентрация азота, раствор витамина В<sub>12</sub> и почвенная вытяжка. Морфологическое

описание культур проводили методами световой микроскопии (светлое поле) с помощью микроскопа Leica DM750 (Германия) через 3-4, 6-7 и 10 недель роста.

**Результаты.** При микроскопировании обращали особое внимание на структуру клеточных комплексов, тип хлоропласта, наличие вторичных каротиноидов, липидов и крахмала.

Клеточные комплексы. Клеточные комплексы у изученных штаммов мы разделили на: (1) одиночные клетки и малоклеточные пакеты (диады, тетрады, октады), которые отмечаются у всех штаммов; (2) сложные комплексы, состоящие из нескольких тетрад, у *T. illinoisensis*, *T. intermedia*, *T. isobilateralis*, *T. pampae*, *T. vinatzeri*; (3) многоклеточные пакеты, состоящие из множества нераспавшихся клеток, у *T. intermedia*, *T. isobilateralis*, *T. pampae*, *T. vinatzeri*.

Тип хлоропласта. Морфологический анализ штаммов показал наличие 2-х типов хлоропласта в зрелых вегетативных клетках: центральный и пристенный. Центральный хлоропласт отмечен у *S. tetrasporum*, *T. aplanospora*, *T. pampae*, *T. vinatzeri*, причем у последних трех штаммов хлоропласт описан как пристенный массивный (Андреева, 1998). Пристенный хлоропласт наблюдался у *T. illinoisensis*, *T. intermedia*, *T. isobilateralis*. Молодые вегетативные клетки всех исследованных штаммов имеют пристенный тип хлоропласта.

Наличие вторичных каротиноидов, липидов и крахмала. Визуально присутствие вторичных каротиноидов было отмечено по изменению цвета культуры с зеленого на оранжевый. Данной способностью из отобранных штаммов отличается только *T. intermedia* (Андреева, 1998), что подтверждается и нашим исследованием.

В эксперименте было установлено влияние состава питательной среды на:

1. структуру пакетов у *T. intermedia* и *T. isobilateralis*. Образование многоклеточных пакетов наблюдалось на более богатой питательной среде Bold 3N, в то время как на Bristol пакеты малоклеточные или в сложных комплексах из тетрад;

2. морфологию хлоропласта *T. vinatzeri*. На менее агаризованной среде Bristol в возрасте 3-х недель штамм имеет центральный хлоропласт, а на той же среде с 2%-ным содержанием агара – пристенный;

3. скорость старения штаммов *T. illinoisensis*, *T. intermedia*, *T. pampae* и *T. vinatzeri* (разрушение хлоропласта, запасание крахмала и липидов, лизис клеток). Крупные, окрашенные в желтый или оранжевый цвет липидные включения, придающие культурам

на среде Bristol (1%-ный агар) коричневатый оттенок, были отмечены в клетках у *T. illinoisensis* (на 10-й неделе роста), у *T. intermedia* (на 6-й неделе); крупные бесцветные липидные включения – у *T. rampae* (на той же среде на 10-й неделе).

Плотность питательной среды оказывала влияние на:

1. образование массивных многоклеточных пакетов у *T. intermedia* на среде Bristol (2%-ный агар);
2. морфологию хлоропласта у штаммов *T. rampae* и *T. vinatzeri*. На среде Bristol (1%-ный агар) в возрасте 3-7 недель роста хлоропласт зрелых вегетативных клеток был центральным, в то время как более агаризованной среде – пристенный.

Продолжительность культивирования влияла на:

1. структуру пакетов зеленых сарциноидных водорослей. По мере старения формировались сложные клеточные комплексы и многоклеточные пакеты у *T. isobilateralis* на среде Bold 3N (1%-ный и 2%-ный агар), *T. rampae* на среде Bristol (1%-ный и 2%-ный агар). Распад многоклеточных пакетов или сложных комплексов при продолжительном культивировании происходил у *T. intermedia* на среде Bristol (1%-ный и 2%-ный агар), *T. vinatzeri* на обеих средах с разным содержанием агара;
2. морфологию хлоропласта у *S. tetrasporum*, *T. aplanospora* и *T. rampae*. Так, на 3-4-й неделе культивирования на всех средах хлоропласт зрелых вегетативных клеток *S. tetrasporum* и *T. aplanospora* центральный губчатый, а к 6-7-й неделе – центральный звездчатый. У *T. rampae* на Bold 3N (1%-ный и 2%-ный агар) и Bristol (2%-ный агар) пристенный хлоропласт молодых вегетативных клеток становился центральным к 10-й неделе культивирования.

### **Заключение.**

Таким образом, в ходе эксперимента было установлено, что свойства питательной среды (состав и плотность) и продолжительность культивирования оказывают влияние на диаκριтические морфологические признаки: тип хлоропласта, устойчивость клеточных комплексов, накопление крахмала или липидов штаммов родов *Tetracystis* и *Spongiosocum*. Следовательно, во избежание ошибок при идентификации зеленых водорослей данных таксонов необходимо придерживаться единого протокола культивирования. Поскольку центральный тип хлоропласта является нетипичным для членов рода *Tetracystis*, требуется переклассификация некоторых его представителей и переоценка таксономического веса этого морфологического признака.

## ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ РИЗОСФЕРНОГО ИЗОЛЯТА LCu2, УСТОЙЧИВОГО К МУЛЬТИЗАГРЯЗНЕНИЮ

**А.А. Нешко<sup>1</sup>, Г.Л. Бурьгин<sup>1</sup>, Е.В. Крючкова<sup>1</sup>, М.А. Макашова<sup>2</sup>, О.В. Турковская<sup>1</sup>, С.Ю. Щеголев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия (aansanura@rambler.ru); <sup>2</sup>СНИГУ им. Н.Г.Чернышевского, Саратов, Россия.

Ризосферные микроорганизмы, выделяемые из объектов окружающей среды с целью их дальнейшего биотехнологического использования, должны быть тщательно идентифицированы. Бактериальный изолят LCu2 выделен из корней люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), выращенной в почве, загрязнённой глифосатом и медью. Ранее нами была продемонстрирована его устойчивость к обоим поллютантам в концентрации 5 мМ. Настоящее исследование посвящено таксономическому определению изолята LCu2 методами филогенетического и биохимического анализа с учётом экологических особенностей.

Последовательность ДНК гена 16S рРНК длиной 1448 пар нуклеотидов была секвенирована в ЗАО «Евроген» [1] и использована нами для биоинформационного анализа. Поиск близкородственных штамму LCu2 микроорганизмов проводили по методике, основанной на усовершенствованной технологии BLASTN, реализованной на сайте EzTaxon [2]. Типовые бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16S рРНК с наиболее высоким процентом идентичности с последовательностью изолята LCu2, относятся к роду *Achromobacter* и представлены в табл. 1. По уровню идентичности последовательностей 16S рРНК штамм LCu2 лишь незначительно (одна-три десятые доли процента) отличается от представителей шести видов рода *Achromobacter* (табл. 1 строки 1-6), входящих в состав таксономической группы *Achromobacter ruhlandii* по данным [3]. На сайте [3] представлены 626 подобных таксономических групп 1734 видов прокариотов, практически неотличимых в технологии 16S рРНК из-за практически полного совпадения последовательностей ДНК данного гена внутри этих групп. Согласно уточненному критерию [4], в качестве порога для различения видов установлено сходство последовательностей генов 16S рРНК 98.65%. Таким образом, все 15 штаммов рода *Achromobacter*, определенные в базе данных [2] как близкородственные изоляту LCu2 (таблица 1), находятся выше этого порога, и их видовые различия определяются на уровне

иных физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств. С большой вероятностью благодаря эффекту горизонтального переноса генов и в зависимости от принадлежности штаммов к той или иной экологической нише.

Аннотационные данные о средах обитания типовых штаммов группы *Achromobacter ruhlandii* [3] показали, что два штамма были выделены из почвенных образцов (*A. ruhlandii* ATCC15749, *A. denitrificanse* DSM30026), а остальные пять – из различных клинических проб человека. Дальнейшую видовую идентификацию изолята LCu2 проводили на основании сравнения его физиолого-биохимических и экологических характеристик с таковыми для членов данной таксономической группы (табл. 2).

Таблица 1. Результаты отбора и ранжирования типовых штаммов микроорганизмов, близкородственных изоляту LCu2.

№	Название	Штамм	Общее число п.н.	Номер в EzTaxon	P, %
1	<i>Achromobacter insolitus</i>	LMG 6003(T)	1458	AY170847	99.86
2	<i>A. ruhlandii</i>	ATCC 15749(T)	1318	AB010840	99.77
3	<i>A. denitrificans</i>	DSM 30026(T)	1474	Y14907	99.72
4	<i>A. aegrifaciens</i>	LMG 26852(T)	1469	HF586507	99.72
5	<i>A. anxifer</i>	LMG 26857(T)	1469	HF586508	99.72
6	<i>A. dolens</i>	LMG 26840(T)	1469	HF586509	99.72
7	<i>A. insuavis</i>	LMG 26845(T)	1469	HF586506	99.44
8	<i>A. spanius</i>	LMG 5911(T)	1446	AY170848	99.37
9	<i>A. marplatensis</i>	B2(T)	1378	EU150134	99.27
10	<i>A. mucicolens</i>	LMG 26685(T)	1476	HE613446	99.24
11	<i>A. animicus</i>	LMG 26690(T)	1475	HE613448	99.23
12	<i>A. pulmonis</i>	LMG 26696(T)	1469	HE798552	99.23
13	<i>A. spiritinus</i>	LMG 26692(T)	1476	HE613447	99.16

14	<i>A. xylosoxidans</i>	NBRC 15126(T)	1488	CP006958	99.10
15	<i>A. piechaudii</i>	ATCC 43553(T)	1489	ADMS01000149	98.83

Прим.: Р – попарное сходство.

Таблица 2. Дифференциальные физиолого-биохимические характеристики штаммов таксономической группы *Achromobacter ruhlandii* [3] и изолята LCu2.

Achromobacter								
	insuavis LMG 26845 T	ruhlandii ATCC 15749T	denitrificans DSM 30026T	dolens LMG 26840T	anxifer LMG 26857 T	insolitus LMG 6003T	aegrifacians LMG 26852T	LCu 2
Реакция по Граму	–	–	–	–	–	–	–	–
Подвижность	–	+	+	+	+	+	+	+
Форма клетки	палочки							
Оксидаза	+	+	+	N	N	+	N	+
Каталаза	N	+	+	N	N	+	N	+
Разжижение желатина	N	–	–	N	N	–	N	–
Уреаза	N	–	–	N	N	–	N	–
Рост при 42°C	–	+	+	+	+	+	–	+
Денитрификация	+	–	+	–	–	–	–	–
Нитрит редукция	+	+	–	+	+	+	+	+

Использование цитрата Na	N	+	+	+	+	+	+	+
Глюкозы	+	+	-	+	-	-	-	+
Маннита	N	-	-	N	N	N	N	-
Ксилозы	+	+	N	N	N	-	+	+

Прим: «+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция; N – нет данных.

На рис. 1 приведена филограмма, полученная с использованием ресурсов [5, 6] (метод MrBayes), отражающая таксономическое окружение изолята LCu2 при идентичности последовательностей генов 16S рРНК, превосходящей 95% и соответствующей межвидовому уровню по данным работы [4]. Совокупность физиолого-биохимических признаков изолята LCu2 оказалась идентичной свойствам типового штамма *A. ruhlandii* ATCC15749, и с точки зрения полифазного подхода выделенный штамм LCu2 следует считать представителем вида *Achromobacter ruhlandii*.

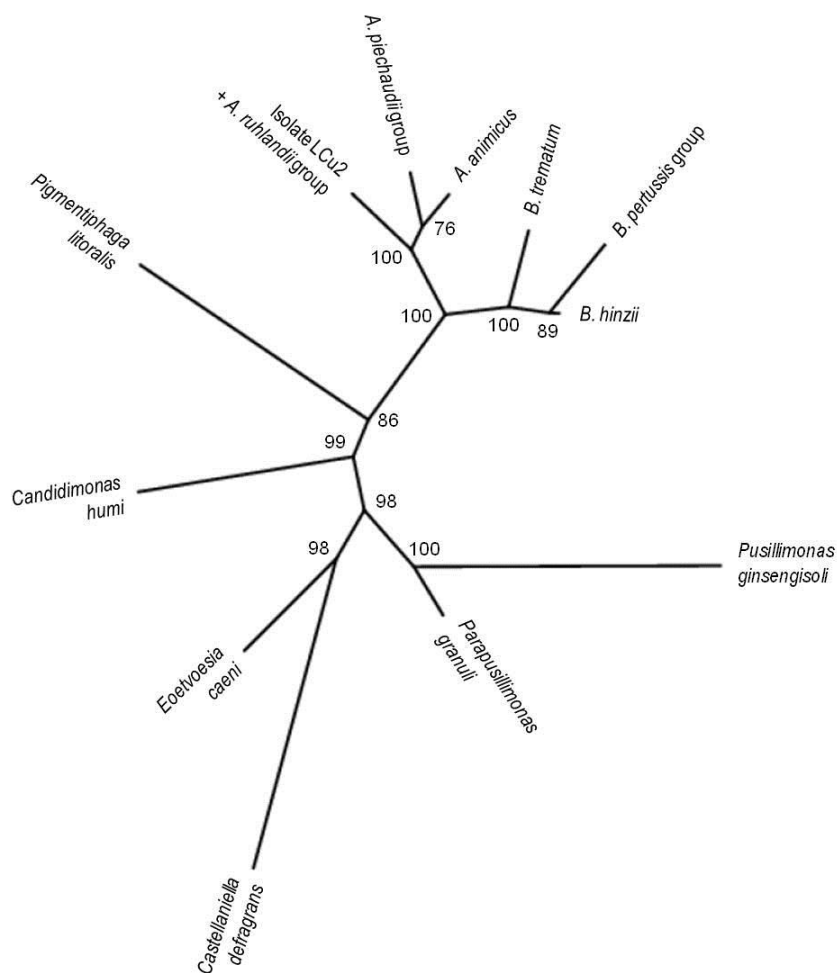


Рис. 1. Филограмма видов, близкородственных изоляту LCu2: A – *Achromobacter*, B – *Bordetella*, цифры – статистическая поддержка узлов (байесовская апостериорная вероятность).

1. ЗАО «Евроген»: [Электронный документ] (<http://evrogen.ru/services/sequencing/servicesequencing.shtml>).
2. EzTaxon: [Электронный документ] (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).
3. Taxonomic Group: [Электронный документ] ([http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/taxonomic\\_group](http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/taxonomic_group)).
4. Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Micro-biol. – 2014. – Vol. 64. – P. 346-351.
5. Clustal Omega: [Электронный документ] (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).
6. Phylogeny.fr. Robust Phylogenetic Analysis For The Non-Specialist: [Электронный документ] (<http://www.phylogeny.fr>)

## **ИНТЕНСИФИКАЦИЯ И ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ГОРОДСКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ**

**А.А. Никитина, Ю.В. Литги, Д.А. Ковалев, А.А. Ковалев, А.Н. Ножевникова**

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

Анаэробное сбраживание является эффективным и безопасным способом утилизации органических отходов и достаточно широко применяется по всему миру. Использование этой биотехнологии позволяет решить не только задачи переработки отходов, но и получить дополнительные полезные продукты, такие как биогаз и биоудобрения. В связи с этим изучение анаэробного сбраживания и поиск путей оптимизации и интенсификации этого процесса является актуальной задачей. Известно, что проведение сбраживания в термофильных условиях способствует увеличению скорости процесса, глубины разложения органических веществ и обеспечивает



дезактивацию патогенных микроорганизмов. Использование смешанных субстратов способствует увеличению выхода биогаза и улучшению качества образующегося биоудобрения. Целью нашей работы было изучение процесса термофильного анаэробного совместного сбраживания смеси органической фракции твердых бытовых отходов (ОФ-ТБО) и осадков сточных вод (ОСВ), как основных видов городских отходов, способов интенсификации и повышения стабильности процесса сбраживания, а также участвующих в нем микроорганизмов.

Одним из залогов успешной работы анаэробного биореактора является применение эффективного инокулята в достаточном количестве при пуске реактора. В лабораторных экспериментах по термофильному анаэробному совместному сбраживанию ОСВ и пищевых отходов, которые составляют около 40% от ОФ-ТБО, было установлено, что для эффективной инициации процесса необходимо не менее 50% инокулята (в расчете на общее органическое вещество) в исходной смеси. Среди изученных инокулятов грунт полигона ТБО являлся наиболее эффективным, т.к. обеспечивал более высокую скорость метаногенеза. Для использования на практике наиболее удобен спрессованный до влажности 90% сброженный ОСВ, т.к. он обладает меньшим объемом и низкой активностью, что крайне важно для его транспортировки. При недостаточном количестве инокулята в сбраживаемой массе происходила дестабилизация термофильного процесса, вызванная накоплением большого количества летучих жирных кислот (ЛЖК) – до 15 г/л. Основной пул ЛЖК составляли ацетат, пропионат и бутират, суммарная концентрация которых превышала 90%.

Дальнейшее изучение процесса совместного сбраживания ОФ-ТБО и ОСВ проводили в лабораторной биогазовой установке с метантенком объемом 50 л. Для запуска биореактора использовали метод постепенного увеличения доли богатого субстрата (ОФ-ТБО) до рабочей концентрации 40%. При этом выход биогаза увеличивался в 2,5 раза, содержание  $\text{CH}_4$  в биогазе возрастало на 10%, разложение ОВ достигало 40-50% при гидравлическом времени удержания (ГВУ) в 10 сут. Также удалось добиться стабильной работы реактора при низкой влажности – около 91%, что является важным результатом, т.к. уменьшение влажности сбраживаемой массы в последнее время является одним из активно исследуемых путей повышения эффективности работы анаэробных биореакторов.

Проблема закисления при сбраживании богатых легкоразлагаемыми веществами субстратов является одной из наиболее частых причин дестабилизации работы биореакторов. Нами показано, что внесение активных консорциумов синтрофных

бактерий и метаногенных архей, адаптированных к повышенной нагрузке по ЛЖК, является эффективным способом восстановления метаногенеза при избыточном накоплении ЛЖК. Такие консорциумы были выделены нами из сброженного осадка термофильного метантенка. Установлено, что высокие концентрации бутирата (до 250 мМ) и пропионата (до 100 мМ) не оказывали негативного влияния на жизнедеятельность синтрофных бактерий и метаногенных архей. Показано, что основным фактором, лимитирующим процесс термофильного синтрофного разложения бутирата и пропионата, являлось накопление ацетата. При увеличении концентрации ацетата в среде микробное сообщество адаптировалось за счет увеличения плотности ацетат-использующих микроорганизмов. Происходила смена видового состава сообщества и замещение ацетокластического метаногенеза на гидрогенотрофный, ацетат при этом использовался ацетат-окисляющими синтрофными бактериями. Молекулярно-биологическими методами был определен микробный состав полученных консорциумов. Метаногенные археи представлены видами: *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Methanotherx thermopila*, *Methanosarcina thermopila*, *M. acetivorans* (99 – 100% сходства). Популяция синтрофных бактерий представлена *Syntrophomonas wolfei*, *Pelotomaculum schinkii*, *Syntrophaceticus schinkii*, *Thermacetogenium phaeum* и *Thermotoga profunda* (93 – 99% сходства) и т.д. Эффективность полученных консорциумов была проверена в эксперименте по сбраживанию ОФ-ТБО. Показано увеличение эффективности удаления ЛЖК и увеличение продукции метана (в 4-5 раз), повышение стабильности и сбалансированности процесса при высокой нагрузке по субстрату, а также возможность снизить ГВУ.

**МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ  
ПРЕДОТВРАЩАЮТ И ОБРАЩАЮТ ФРАГМЕНТАЦИЮ МИТОХОНДРИЙ  
ДРОЖЖЕЙ *DIPODASCUS MAGNUSII*.**

**А.П. Овченкова<sup>1</sup>, Т.Н. Голева<sup>1</sup>, А.Г. Рогов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, Россия

Термин «окислительный стресс» в настоящее время используется для обозначения повышенной внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК). В клетке основными источниками АФК являются митохондрии. Избыточная продукция АФК митохондриями связана, как правило, с их дисфункцией и представляет серьезную угрозу для жизни клетки.

Целью работы явилось изучение взаимосвязи между индуцированным

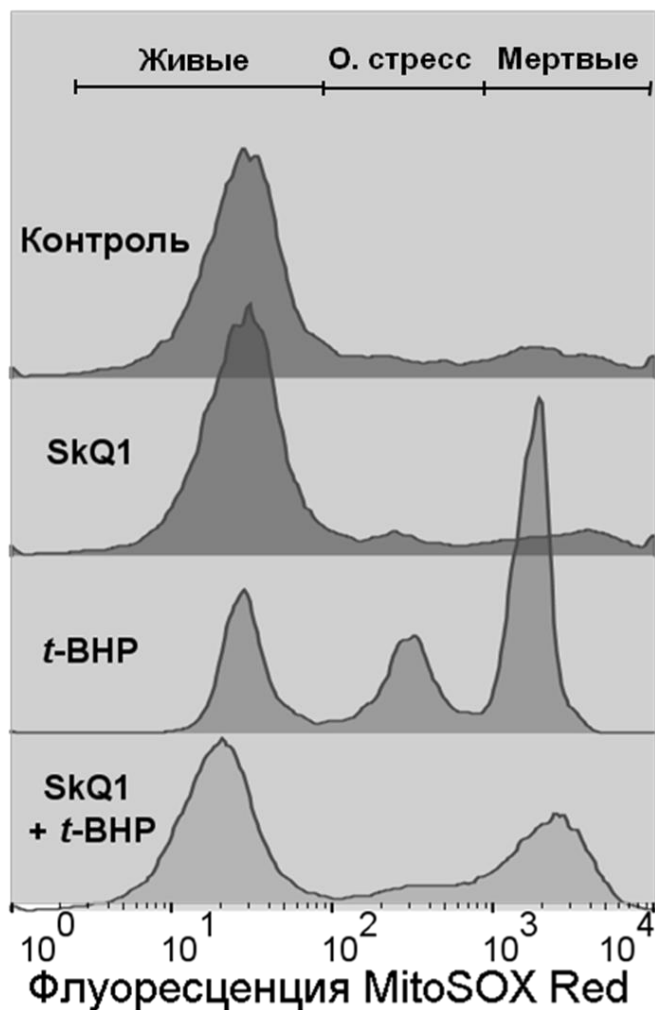


Рис. 1. Окислительный стресс в клетках *D. magnusii*. Антиоксидантное действие SkQ1.

дрожжей и значительно снижала уровень клеточной смерти, вызванной окислительным стрессом (Рис. 1).

Показано, что под действием окислительного стресса, индуцированного трет-бутилгидропероксидом (*t*-ВНП) митохондрии дрожжей *D. magnusii* частично или полностью, в зависимости от времени инкубации и концентрации прооксиданта, утрачивали свою разветвленную структуру (Рис. 2).

окислительным стрессом и фрагментацией митохондрий дрожжей аэробного типа обмена *Dipodascus magnusii*. Дрожжи *D. magnusii* имеют относительно большие размеры клеток и в норме обладают разветвленной митохондриальной сетью, что делает их перспективной моделью для изучения фрагментации митохондрий методом флуоресцентной микроскопии.

В работе найдено, что трет-бутилгидропероксид вызывал окислительный стресс в клетках дрожжей *D. magnusii* (Рис. 1). Для предотвращения или ослабления последствий окислительного стресса использовали липофильные митохондриально-направленные антиоксиданты нового поколения SkQ1, SkQT1 и SkQThy. Преинкубация с антиоксидантами снижала уровень окислительного стресса в клетках

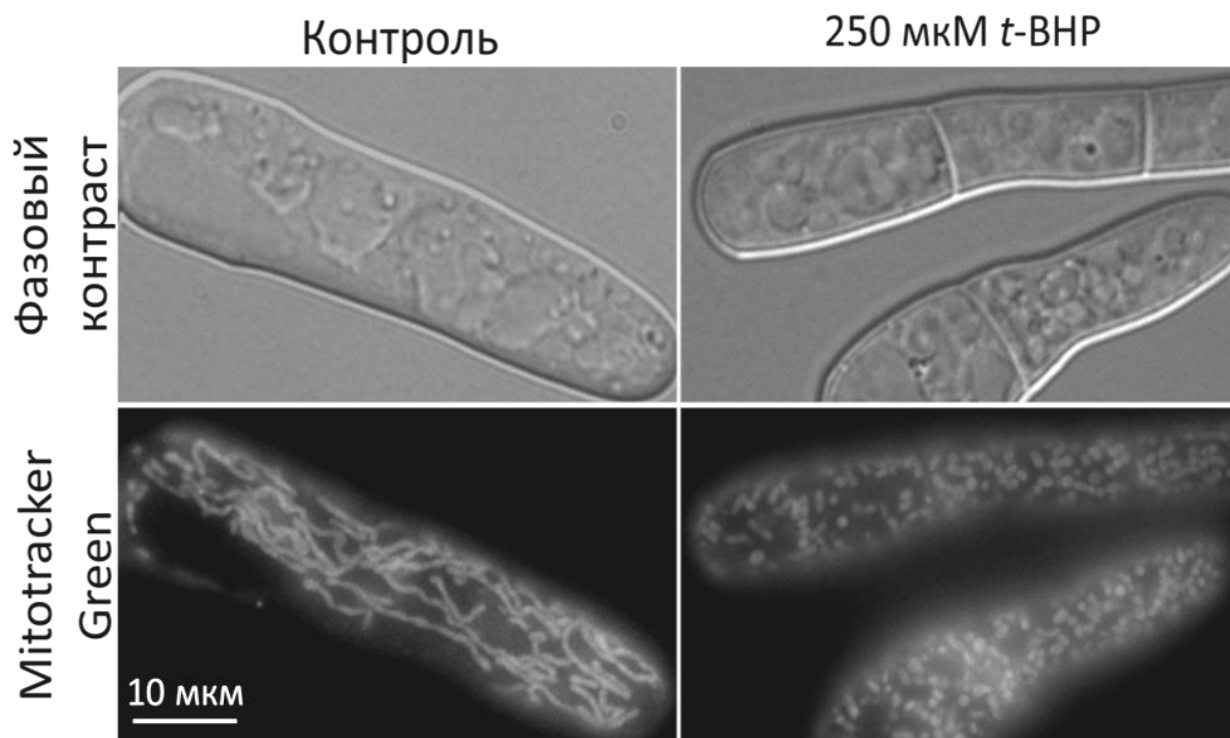


Рис. 2. Фрагментация митохондрий *D. magnusii* под действием *t*-ВНР.

Показано, что предварительная инкубация клеток с низкими концентрациями митохондриально-направленных антиоксидантов SkQ1, SkQT1 и SkQThy предотвращала фрагментацию митохондрий, вызванную окислительным стрессом. Кроме того, впервые показано, что митохондриально-направленные антиоксиданты способны обращать фрагментацию митохондрий, т.е. возвращать фрагментированным в результате воздействия окислительного стресса митохондриям *D. magnusii* их природную сетевую структуру (Рис. 3).

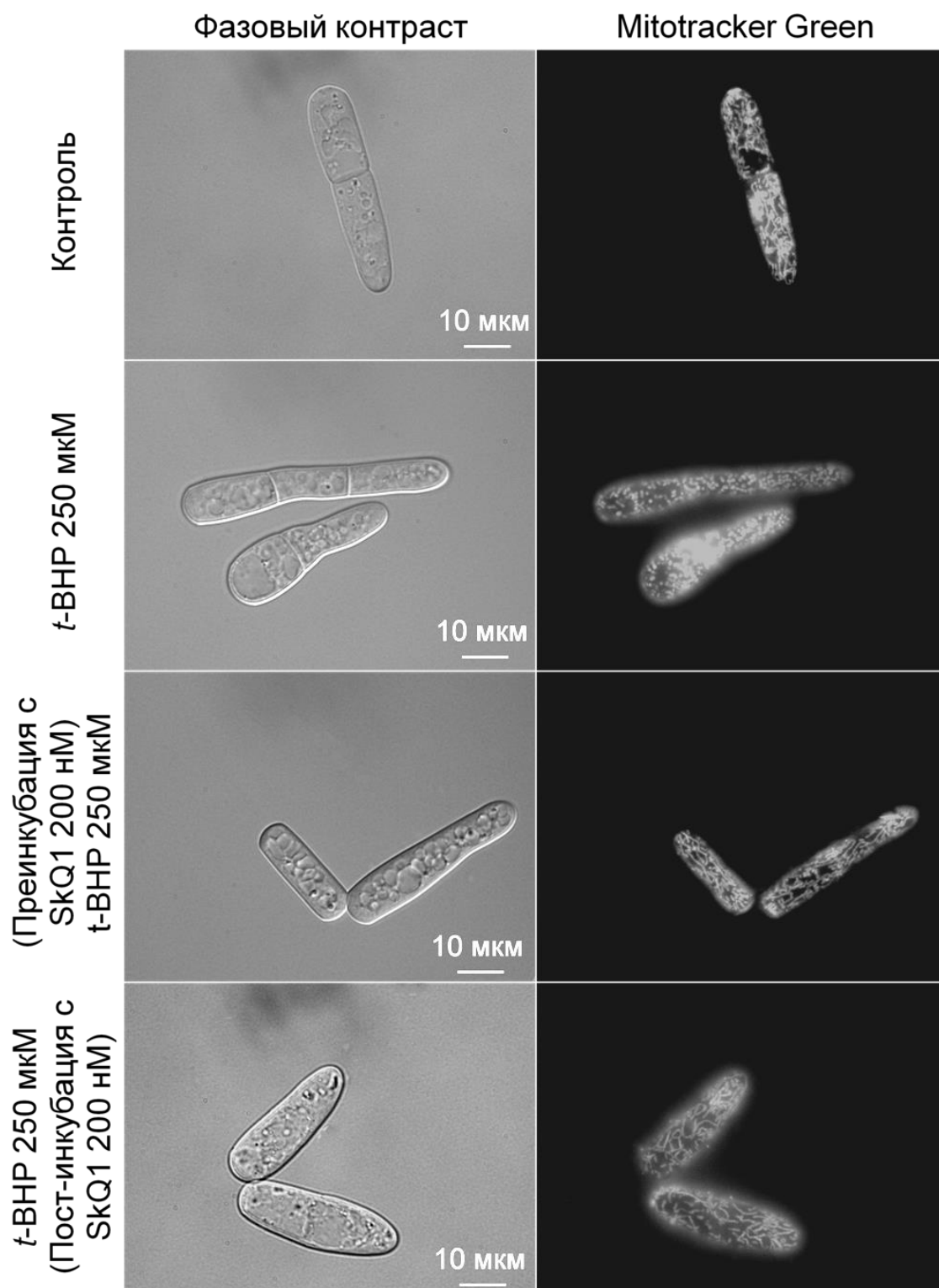


Рис. 3. SkQ1 предотвращает и обращает фрагментацию митохондрий дрожжей *D. magnusii*.

Полученные данные показали перспективность использования дрожжей в качестве модели для изучения взаимосвязи между окислительным стрессом и дисфункцией митохондрий.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 16-04-01040, 16-34-01272) и РНФ (№ 14-24-00107).

# АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЛИШАЙНИКОВ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ И ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Я. А. Ахременко<sup>1</sup>, И. А. Прокопьев<sup>2</sup>, А. А. Поляниченко<sup>1</sup>, А. А. Федоров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, г. Якутск

<sup>2</sup> Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

В настоящее время отмечается стойкая тенденция нарастания явления антибиотикорезистентности, обусловленная широким, зачастую нерациональным, использованием антибиотических средств и, как следствие, появлением мутантных высоковирулентных, полирезистентных микроорганизмов. В связи с этим актуальными являются поиски новых нестандартных источников антибиотиков.

Флора Республики Саха (Якутия) характеризуется большим разнообразием высших растений, мохообразных и лишайников, которые издревле применяются в народной медицине для лечения гнойно-воспалительных заболеваний у человека и животных, а значит, могут содержать вещества, обладающие антибиотической активностью. Лишайниковые кислоты – группа уникальных вторичных метаболитов лишайников, не встречающаяся у других организмов. Одной из функций лишайниковых кислоты может быть защита от действия высокой инсоляции, путем поглощения избыточного УФ излучения (Rundel, 1968). Также было обнаружено ингибирующее действие лишайниковых кислот как на рост и развитие высших растений, так низших организмов – бактерии, водорослей, грибов (Равинская, 1984; Ingolfsdottir, 2002; Lawrey, 1986). Из лишайниковых кислот наиболее широко распространенной и хорошо изученной является усниновая кислота (Дембицкий, Толстиков, 2005; Равинская, 1984; Шапиро, 1991; Vjerke et al., 2005). Известно, что усниновая кислота обладает выраженным бактерицидным действием в отношении грамположительных и микобактерий, включая штаммы, устойчивые к антибиотикам (Lauterwein et al., 1995; Cocchietto et al., 2002). В настоящее время препараты на основе усниновой кислоты нашли свое применение в медицине в качестве противомикробного средства для обработки ран и ожогов (Машковский, 2005). В слоевищах лишайников содержится до 80% углеводов, половина которых представлена - гомополисахаридом лихенином, а также изолехенином. Высокая антибиотическая активность связана, прежде всего, с присутствием в лишайниках усниновой кислоты, которая останавливает процессы окислительного фосфорилирования в клетках бактерий и тем самым вызывает их гибель. Эти кислоты выборочно влияют на возбудителей инфекции, не повреждая нормальной микрофлоры слизистой оболочки, что дает им

преимущество над другими антибиотическими препаратами широкого спектра действия (N.Manojlovi, B.Rankovi). Результаты ранее проведенных исследований показали, что содержание биологически активных веществ в растительных организмах зависит от условий места произрастания/обитания, а также от антропогенных факторов. Установлено, что в определенном интервале интенсивности климатических факторов в растительных тканях в 1,8 ÷ 2,5 раза увеличивается общее содержание биологически активных веществ регуляторного и защитного действия. Это дает основание полагать, что концентрация и активность усниновых кислот может варьировать от места произрастания (Слонов Т.Л., Слонов Л.Х.).

Объектом исследования являлись спиртовые экстракты полученные на основе лишайников (*Evernia esoridiosa*, *Flavocetraria cuculata*, *Cladonia arbuscula*, *Cladonia stellaris*, *Cladonia amaurocraea*) произрастающих в климатических условиях Центральной Якутии из слоевищ лишайников. Измельченные слоевища лишайников подвергались экстракции 96%-м спиртом, в соотношении 1:20, экстракция проводилась в течение 10 дней. Содержание растворенных веществ в экстрактах лишайников *Cladonia stellaris*, *Cladonia arbuscula*, *Evernia esorediosa*, *Cladonia amaurocraea* и *Flavocetraria cucullata* составляло 3.3, 2.4, 4.2, 3.3 и 3.9 мг/мл соответственно. Концентрацию растворенных в экстрактах веществ определяли путем удаления этанола с помощью роторного испарителя, и взвешивания сухого остатка. Определение антибиотической активности спиртовых экстрактов лишайников проводили методом двухкратных серийных разведений. В качестве тест-культур использовались контрольные штаммы Американской коллекции типовых культур: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213. Культивирование тестовых культур проводили в жидкой питательной среде МПБ. В качестве «отрицательного» контроля использовали пробирку с питательной средой и соответствующей тест-культурой, но не содержащую экстракт лишайника. Учет результатов проводили визуально, сравнивая с ростом контрольного штамма в пробирке без экстракта. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста тест-культуры. Из пробирок с отсутствием видимого роста делали высеив на соответствующие плотные питательные среды. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принимали минимальную концентрацию, которая вызывает полную гибель стандартных тест-штаммов бактерий. Наиболее перспективный экстракт тестировали на диких штаммах. Поскольку в исследовании использовались 96% спиртовые экстракты, для определения истинной антибиотической активности лишайников, параллельно

определялась активность 96% спирта в отношении тех же тест-культур с использованием той же методики.

Для определения истинного антибиотического эффекта проводили сравнение с таковой активностью 96% спирта. Было установлено, что бактерицидное и бактериостатическое воздействие 96% спирта проявлялось в основном в разведениях в 2 и 4 раза соответственно. Исследование показало, что выраженность антимикробной активности зависит от рода тестируемого микроорганизмов. Так бактериостатическое действие экстрактов в отношении *E.coli* проявлялось при концентрации экстракта 12,5-6,2 мг/мл, бактерицидное - 12,5мг/мл. Относительно *P. aeruginosa* подавление роста отмечалось при использовании концентрации экстракта 12,5-6,2 мг/мл, полная гибель – также 12,5-6,2 мг/мл. Для грамположительных бактерий (*S.aureus*, *E.faecalis*) соответствующие значения были вдвое ниже, МИК варьировала от 3,1 до 1,5мг/мл, МБК – 6,2-3,1 мг/мл. Кроме того, проявление противомикробного действия отличалось у разных экстрактов. Так, наиболее широкий спектр активности и наименее низкие МИК и МБК выявлены у экстрактов *Evernia Esoridiosa*, *Cladonia Arbuscula*. Экстракт *Evernia Esoridiosa* показал высокую антибиотическую активность в отношении диких штаммов. Средние показатели антибиотической активности данного экстракта в отношении диких штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* составили: МИК 2,8 мг/мл и 2,9 мг/мл, а для МБК 4,4 мг/мл и 5,5 мг/мл соответственно.

## **ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ БЕТА-N-МЕТИЛАМИН-L-АЛАНИНА (БМАА)**

**Попова А.А.<sup>1</sup>, Цитрина А.А.<sup>2</sup>, Кокшарова О.А.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> НИИ ФХБ имени А.Н. Белозарского, МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Цианобактерии способны синтезировать цианотоксины, представляющие собой молекулы различной природы. Одним из цианотоксинов является нейротоксическая небелковая аминокислота БМАА (бета-метиламино-L-аланин), накопление которой в организме способствует развитию нейродегенеративных заболеваний человека, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофный склероз (БАС). Одним



из механизмов действия БМАА является его связывание с глутаматным рецептором (GluR) в мозге человека, что приводит к повреждению моторных нейронов и развитию этих заболеваний. Показано, что БМАА, связываясь с GluR, повышает уровень внутриклеточного кальция. Позднее глутаматные рецепторы были обнаружены у растений и у цианобактерий. Роль рецептора в клетках цианобактерий не изучена.

Целью данного исследования было определение влияния экзогенного БМАА на изменение внутриклеточной концентрации кальция в клетках цианобактерий. В качестве модельного организма была использована нитчатая азотфиксирующая цианобактерия *Nostoc* sp. PCC 7120.

Для определения изменения внутриклеточных концентраций кальция используют окрашивание клеток флуоресцентными красителями. Одним из широко используемых для этой цели красителей является флуорофор Fura 2-AM, который применяют, в частности, для измерения концентраций кальция в грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Selenomonas ruminantium*) и грамположительных (*Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptomyces coelicolor*) бактериях (и протопластах растений, поэтому флуорофор Fura 2-AM был выбран нами для измерений внутриклеточных концентраций кальция в клетках цианобактерий).

Для определения отношения интенсивности флуоресценции клеток цианобактерий, окрашенных Fura 2-AM, после возбуждения при двух длинах волн – 340 нм и 380 нм, и эмиссии при 510–550 нм мы использовали эпифлуоресцентный микроскоп (Axiovert 10; Zeiss, Оберкохен, Германия), оснащенный ксеноновой лампой (XBO 75; Zeiss), и производили измерения флуоресценции на отдельных клетках цианобактерий с помощью объектива EC Plan-Neofluar 40x/0.75 для фазового контраста. В качестве отрицательного контроля к клеткам цианобактерий добавляли среду роста BG11<sub>N</sub>, содержащую 61.2 нМ Ca<sup>2+</sup>. В качестве положительного контроля к клеткам добавляли абсцизовую кислоту (ABA), которая увеличивает на 20% концентрацию внутриклеточного кальция при действии на клетки цианобактерии *Nostoc* 6720 (Smith et al., 1987). Для определения эффекта БМАА на изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция в случае, когда глутаматный рецептор связан со своим лигандом – L-глутаматом, к клеткам сначала добавляли 10 мкМ L-глутамата, а затем после установления стабильных значений флуоресценции добавляли к тому же образцу 10 мкМ БМАА. Для определений констант, необходимых для расчета концентраций кальция, строили калибровочную кривую согласно Gryniewicz et al. (1985) и Thomas and Delaville, (1991). С помощью значений констант, полученных из калибровочной кривой, была посчитана ориентировочная

концентрация внутриклеточного кальция  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках *N. sp.* PCC 7120, которая составила  $\sim 144 \pm 90$  нМ ( $10^{-9}$  моль).

Изучение действия БМАА на изменение концентрации кальция проводили в индивидуальных клетках цианобактерии. Измерения были выполнены в 21 клетке. В 8 из них кривые флуоресценции были нестабильны. В 10 клетках изменение флуоресценции колебалось на уровне погрешности метода ( $0.75 < \dots < 10$ , %). В остальных трех образцах наблюдалось заметное увеличение флуоресценции клеток дикого типа ( $> 15\%$ ). При пересчете значений флуоресценции на концентрацию  $[Ca^{2+}]_i$  в нМ было определено, что в 5 клетках из 21, добавление БМАА значительно увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция в клетках дикого типа ( $417 \pm 188$  нМ). Таким образом, было определено, что в 38% случаях (5 из 13) стабильных измерений добавление БМАА в среднем повышает внутриклеточную концентрацию кальция на  $\sim 65\%$ . При блокировании рецептора лигандом (L-глутаматом) увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция после добавления БМАА к клеткам *N. sp.* PCC 7120 не наблюдалось в 8 клетках из 9. Это косвенно может свидетельствовать о том, что БМАА в клетках цианобактерий может вступать во взаимодействие с глутаматным рецептором.

Для повышения статистической значимости результатов измерения также проводились на суспензии клеток цианобактерий флуоресценция измерялась при помощи фильтров 485 нм (возбуждение) и 535 нм (эмиссия) на мультиридере Beckman coulter DTX800, в 96 луночных планшетах, что позволило сократить время между измерениями в разных пробах. Вероятно, из-за сложного строения клеточной стенки цианобактерий краситель Fura-2 AM проникал лишь в небольшой процент клеток *N. sp.* PCC 7120 и ассоциировал в основном с клеточной поверхностью. В ряде экспериментов также использовался другой флуорофор Fluo-4 AM, с помощью которого клетки цианобактерий удалось пометить с большей эффективностью, чем с помощью Fura-2 AM. Предварительные результаты продемонстрировали увеличение концентрации кальция в клетках цианобактерий при воздействии 50 мкМ БМАА в условиях азотного голодания в 5-7 раз. В условиях роста клеток в среде, содержащей нитрат натрия, эффекты добавления БМАА не были столь заметны.

По результатам микроскопических наблюдений (конфокальный микроскоп Leica SP5) нами были сделаны следующие предварительные выводы:

- Локализация флуоресцентного зонда Fluo-4 может не соответствовать цитозоллю клетки. Т.к. цианобактерии обладают двухмембранной клеточной стенкой и межмембранным

пространством, зонд может накапливаться в одном из этих компартментов, что может вносить значительные погрешности в измерения (отсутствие значимой реакции на большие дозы ионофора кальция).

- Наиболее значительное накопление зонда Fluo-4 было отмечено в погибающих и морфологически измененных клетках что так же может вносить погрешности в измерения.

- Поглощение испускаемых зондом фотонов белковыми комплексами, содержащими флуорохромы (хлорофилл *a* и фикобилины) может быть причиной отсутствия значительного увеличения эмиссии Fluo-4 в ответ на воздействие.

Таким образом, проведенные исследования с использованием двух разных флуоресцентных красителей для мониторинга ответа цианобактериальных клеток на изменение количества ионов кальция при воздействии БМАА продемонстрировали наличие серьезных методических сложностей. В работе было установлено, что метод определения внутриклеточных концентраций кальция путем окрашивания клеток флуоресцентными красителям не является оптимальным для цианобактериальных культур вследствие низкой проницаемости клеточной стенки цианобактерий для красителей и трудностей при определении флуоресценции красителя внутри клеток.

Для дальнейших исследований влияния БМАА на концентрацию ионов кальция внутри цианобактериальных клеток нами будет использован другой экспериментальный подход, основанный на использовании люминесцентного белка экворина, активируемого ионами кальция, в рекомбинантном штамме *N. sp.* PCC 7120 (Torrecilla et al., 2000).

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00656.

## **ВЛИЯНИЕ СОСТАВА КРАХМАЛОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ НА БИОСИНТЕЗ ТАКРОЛИМУСА (FK-506) ШТАММОМ *STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS* ВКМ АС-2618Д**

**В.Ю. Пошехонцева<sup>1,2</sup>, В.В. Фокина<sup>1</sup>, А.А. Шутов<sup>1</sup>, М.В. Донов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

Такролимус (FK-506) – 23-членный лактон, относящийся к группе природных макролидов. FK-506 является мощным иммуносупрессорным агентом и используется при

трансплантации органов и тканей, лечении дерматологических и аутоиммунных заболеваний. В настоящее время внимание к такролимусу возрастает в связи с его нейропротективной и нейрорегенеративной активностью и потенциальной возможностью использования для лечения злокачественных опухолей [1].

Применяемые в химии и технологии крахмала понятия для его полисахаридных компонентов (амилозы и амилопектина) или продуктов его частичного расщепления обозначают общим термином «полисахариды крахмала». Особенность этого класса веществ заключается в том, что их молекулы состоят из ангидроглюкозных единиц, связанных между собой  $\alpha$ -1,4- или  $\alpha$ -1,6-глюкозидными связями. При расщеплении крахмала образуется ряд продуктов, представляющих собой структурные фрагменты первоначальных молекул: линейные или разветвленные олигосахариды, а также глюкоза [2]. Зачастую состав крахмала зависит от первичного сырьевого источника (картофель, кукуруза и др.), а также способа получения.

Крахмал и биопродукты, получаемые в результате его частичного гидролиза (декстрины), часто используются в качестве основного источника углерода при приготовлении ростовых и продуктивных сред для биосинтеза такролимуса. Однако высокая вязкость клейстера и желирующая способность крахмала, обусловленные составом и соотношением олиго- и полисахаридов, часто осложняют практическое использование крахмалов в ферментационных процессах.

Целью настоящего исследования являлось выяснение влияния состава крахмалов на эффективность биосинтеза такролимуса штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д.

Посевной материал получали инокулированием ростовой среды 4% (об/об) криогенной культурой *S. tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д и инкубированием при 25°C и 220 об/мин 48 часов. Для биосинтеза FK-506 10% (об/об) выросшей посевной культуры использовали для засева продуктивных сред, содержащих 50 г/л крахмала, и культивировали в аналогичных условиях 10-12 суток. В течение ферментации вели подпитку 5% раствором крахмала (разовое внесение составляло 0,3 г), подачу добавок начинали с 25 часов. Поли- и олигосахаридный состав крахмалов исследовали с помощью: 1) определения чувствительности к йоду, 2) осаждения амилозы бутанолом, 3) осаждения поли- и олигосахаридов крахмалов этанолом, 4) определения содержания восстанавливающих сахаров. Концентрацию такролимуса оценивали методом ВЭЖХ [3].

Ранее нами были установлены преимущества использования в качестве компонента питательной среды для биосинтеза такролимуса картофельного крахмала перед крахмалами из других источников (кукуруза, горох, тапиока и др.) [4].

В настоящей работе использовали четыре картофельных крахмала от разных производителей (табл. 1). Нами были оценены их основные характеристики.

Таблица 1. Характеристики крахмалов, использованных в работе

№	Наименование крахмала	Состав крахмала, %	
1	крахмал растворимый от «Difco» (Becton, Dickinson and Company, США)	Ахродекстрины	≤ 20
		Мальтодекстрины	≥ 80
		Эритродекстрины	6-8
2	крахмал растворимый (Амилодекстрин) от «ЗАО Купавнареактив» (ГОСТ 10163-76)	Амилоза	≤ 20
		Смесь амилопектина и амилодекстрина	≥ 50
		Смесь ахродекстринов и мальтодекстринов	≤ 23
3	крахмал растворимый от «ООО Лабкомплект, г. Москва» (ГОСТ 10163-76)	Смесь амилозы и амилодекстринов	≤ 93
		Мальтодекстрины	6-7
4	крахмал водорастворимый от «ООО Индикатор, г. Уфа» (ГОСТ 10163-76)	Смесь амилозы и амилодекстринов	≤ 93
		Мальтодекстрины	6-7

Максимальный выход такролимуса (свыше 460 мг/л) был отмечен для крахмала 1, содержащего до 80% мальтодекстринов. Снижение выхода такролимуса наблюдалось при уменьшении содержания мальтодекстринов и ахродекстринов (варианты 2-4). Тем не менее, среды, содержащие крахмалы, представленные смесью коротких и длинных полисахаридов, обеспечивали выход такролимуса свыше 350 мг/л. Примечательно, что использование в качестве единственного источника углерода глюкозы и мальтозы приводило к ингибированию биосинтеза FK-506.

Результаты по эффективности биосинтеза такролимуса при использовании крахмалов, обладающих различным составом полисахаридов, представлены на рис. 1.

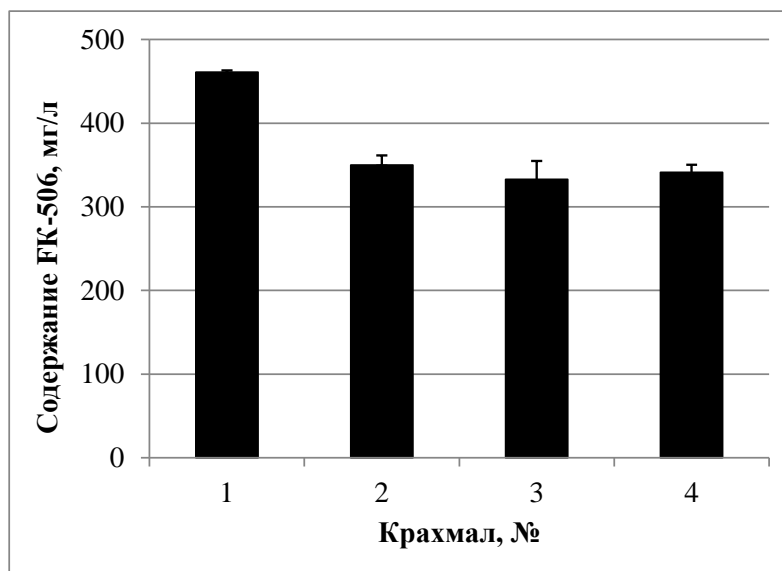


Рис. 1. Эффективность биосинтеза такролимуса (FK-506) на продуктивных средах, содержащих крахмалы с разным составом полисахаридов.

Таким образом, для биосинтеза такролимуса можно использовать крахмалы, представленные как высокомолекулярными, так и низкомолекулярными декстринами, однако применение крахмалов с высоким содержанием ахро- и мальтодекстринов способствует повышению эффективности биосинтеза такролимуса культурой *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618D. Полученные результаты будут использованы при создании технологии производства такролимуса.

#### Список литературы:

1. Ordóñez-Robles M., Rodríguez-García A., Martín J. Target genes of the *Streptomyces tsukubaensis* FkbN regulator include most of the tacrolimus biosynthesis genes, a phosphopantetheinyl transferase and other PKS genes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100 (18). P. 8091-8103.
2. Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум Ф. Избранные методы исследования крахмала. – Москва: Пищевая промышленность, 1975. 180 с.
3. Goranovic D., Kosek G., Mrak P., Fujs S., Horvat J., Kuscer E., Kopitar G., Petcovic H. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis // Biol Chem. 2010. V. 285 (19). P. 14292-14300.
4. Пошехонцева В.Ю., Гулевская С.А., Суходольская Г.В., Фокина В.В. Влияние крахмала на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Сб. тез. 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. 2015. С. 39.

# ОЦЕНКА АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭНДЕМИЧНЫХ И ГЛУБОКОВОДНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД

**Е.С. Протасов<sup>1</sup>, Д.В. Аксенов-Грибанов<sup>1,2</sup>, И.В. Войцеховская<sup>1</sup>, Мадьярова Е.В.<sup>1</sup>,  
Широкова Ю.А.<sup>1</sup>, Скобин Г.А.<sup>1</sup>, Ржечицкий Я.А.<sup>1</sup>, Димова М.Д., М.А. Тимофеев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биологии ФГБОУ ВО «Иркутский  
государственный университет»

<sup>2</sup> АНО Байкальский исследовательский центр

Развитие антибиотикоустойчивости патогенных штаммов микроорганизмов требует поиска новых антибиотиков. Одними из наиболее активных продуцентов антибиотиков, используемых в современной фармацевтической индустрии, являются актинобактерии [Berdy, 2005]. В ходе настоящей работы проведено выделение актинобактерий из эндемичных и глубоководных байкальских амфипод (*Amphipoda*, *Crustacea*), оценена антибиотическая активность экстрактов против модельных штаммов бактерий и дрожжей, а также выполнен анализ состава соединений.

Из байкальских и глубоководных эндемичных амфипод рода *Ommatogammarus* выделено 42 штамма актинобактерий. На основе анализа участка гена 16S рНК установлено, что 39 штаммов принадлежат роду *Streptomyces*, один - роду *Micromonospora* и один - к роду *Pseudonocardia*. Каждый штамм культивирован на 3-х жидких питательных средах: NL-19, SG, ISP. Из культуральной жидкости и биомассы были получены экстракты, которые использовали для проведения антибиотических тестов против модельных штаммов бактерий и дрожжей. Выявлено, что восемь штаммов ингибировали рост как грам-положительных, так и грам-отрицательных микроорганизмов. Они представлены следующими штаммами: *Streptomyces* sp. IB2015P60-1HS, *Streptomyces* sp. IB2015P62-1HS, *Streptomyces* sp. IB2015P64-2, *Streptomyces* sp. IB2015P102-1, *Streptomyces* sp. IB2015P104-1, *Streptomyces* sp. IB2015P113-3, *Streptomyces* sp. IB2015P113-4, *Streptomyces* sp. IB2015P113-10, *Streptomyces* sp. IB2015P113-11, *Streptomyces* sp. IB2015P113-16, *Streptomyces* sp. IB2015P114-2, *Streptomyces* sp. IB2015P117-1, *Streptomyces* sp. IB2015P119-1, *Streptomyces* sp. IB2015P119-2. Четыре выделенных штамма (*Streptomyces* sp. IB2015P66-2, *Streptomyces* sp. IB2015P67-2, *Streptomyces* sp. IB2015P69-1, *Streptomyces* sp. IB2015P119-5) подавляли рост только грам-отрицательных, но не подавляли развитие грам-положительных тест-культур. Всего рост грам-положительных текст культур ингибировали 22 выделенных штамма из 42, а рост

грам-отрицательных - 12. Экстракты культуральной жидкости штаммов *Streptomyces* sp. IB2015P113-12 и *Streptomyces* sp. IB 2015 P 113-2, полученные при культивировании микроорганизмов на среде NL-19 и SG подавляли рост антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli* TolC и *E. coli* K12.

Одновременное ингибирующее действие на рост дрожжей *S. cerevisiae* и *C. albicans* оказывали 16 штаммов. Двенадцать из них подавляли рост только *S. cerevisiae*, а два - подавляли рост *C. albicans*, и не оказывали влияния на *S. cerevisiae*.

Экстракты биомассы и культуральной жидкости активного штамма *Streptomyces* sp. IB2015P113-12 были выбраны для проведения высоко эффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией высокого разрешения. В культуральной жидкости и биомассе штамма, выращенного на среде NL-19, обнаружено 48 мажорных соединений (пиков), в том числе 41 соединение было зарегистрировано в экстракте культуральной жидкости и 30 – в экстракте биомассы. 25 соединений (пиков) представлены общими и обнаружены в обоих типах экстрактов.

Для идентификации соединений использовали базу данных Dictionary of Natural Products (CRC-press), в которой для поиска соответствия между соединениями в качестве параметров использовали точный молекулярный вес, спектр поглощения в УФ-диапазоне и источник выделения (микроорганизм). Из 48 соединений только пять нашли соответствие в базе данных. Остальные 43 соединения представляются новыми и ранее не зарегистрированными в базе данных Dictionary of Natural Products.

В культуральной жидкости и биомассе штамма *Streptomyces* sp. IB 2015 P 113-12 были обнаружены такие соединения, как стрептофеназин (CRC code – PNS75-76), перлимайцин (CRC code – FYV44), майамайцин (CRC code – QFQ37) и боксазомайцин С (CRC code – HQS01). Антибиотик SS 8201B (CRC code – CLB35) был обнаружен только в составе экстракте, полученного из культуральной жидкости.

Таким образом показано, что штаммы актинобактерий, выделенные из эндемичных байкальских амфипод, являются перспективными продуцентами новых и уже известных биологически активных соединений с антибиотической активностью.

Данное исследование было проведено при частичной финансовой поддержке ряда грантов и проектов, в т.ч.: проектной части Госзадания (6.382.2014/К), проекта РФФИ (N 14-04-00501, 16-34-00686) и РНФ (14-14-00400).



## **MYROTHESCIUM RORIDUM – ПРОДУЦЕНТ ГОЛУБОЙ ОКСИДАЗЫ, АКТИВНОЙ В НЕЙТРАЛЬНО-ЩЕЛОЧНЫХ УСЛОВИЯХ**

**Ренфельд Ж.В.<sup>1,2</sup>, Коломыцева М.П.<sup>1</sup>, Мясоедова Н.М.<sup>1</sup>, Самойлова А.С.<sup>1</sup>,  
Подъяблонская Е.В.<sup>1</sup>, Головлева Л.А.<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Пушчинский государственный естественно-научный институт (ПушГЕНИ),  
Пушино, Россия;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии  
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скребина Российской академии наук; пр-кт  
Науки 5, г. Пушино, Московской области, 142290; e-mail: golovleva@ibpm.pushchino.ru

Лакказы (бензендиол:кислород оксидоредуктаза, ЕС 1.10.3.2, “голубая” оксидаза) является одним из наиболее распространённых инструментов в современной биотехнологии для деградации ксенобиотиков, трансформации продуктов разложения лигнина, делигнификации и отбеливания растительного волокна. На сегодняшний день в литературе хорошо описаны лакказы, продуцируемые грибами базидиомицетами, но их ферменты, как правило, малоактивны при нейтральных и щелочных значениях рН, что препятствует их применению в ряде биотехнологических процессов. Поэтому поиск новых высокоэффективных микроорганизмов, способных продуцировать лакказы с алкалофильными свойствами по-прежнему актуален.

Целью настоящей работы являлся поиск активного грибного продуцента лакказной активности по отношению к фенольным соединениям в нейтрально-щелочных условиях с последующей очисткой и характеристикой выделенного фермента.

Для скрининга были взяты 17 штаммов грибов аскомицетов и 1 штамм базидиомицета из коллекции лаборатории энзиматической деградации органических соединений ИБФМ РАН. Самым активным продуцентом лакказной активности по отношению к фенольным соединениям в нейтрально-щелочных условиях оказался гриб *Myrothecium roridum*. Оптимизированы условия продукции лакказной активности штамма. Разработана схема очистки фермента с лакказной активностью из культуральной жидкости *Myrothecium roridum*, состоящая из пяти этапов с использованием анионообменной и гидрофобной хроматографии, а также гель- и ультрафильтрации. Исследованы физико-химические и кинетические свойства выделенного фермента, такие как: субъединичная и нативная массы, рН и температурный оптимумы, кинетические константы. Выделенная оксидаза имела поглощение в области 600-610 нм и являлась

мономером с массой субъединицы 77 кДа, рН-оптимумами реакций с серингалдазином при рН 7,8, с 2,6-диметоксифенолом – при рН 7,4 и температурным оптимумом при 65 °С.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение 14.616.21.0001, RFMEFI61614X0001).

## РАЗРАБОТКА ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* – ПРОДУЦЕНТА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ РАПАМИЦИНА

**В.В. Савельева<sup>1</sup>, Т.М. Воинова<sup>2</sup>, Е.В. Глаголева<sup>1</sup> В.В. Джавахия<sup>1</sup>**

1-Институт «Биоинженерии» РАН, Москва, Россия

2-ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Большие  
Вяземы, Россия

### Введение

Рапамицин (сиролимус) является продуктом метаболизма актиномицета *Streptomyces hygroscopicus* и представляет собой азотсодержащий макролид с эмпирической формулой  $C_{51}H_{79}NO_{13}$ , имеющий в своем составе 31-членное лактонное кольцо (рис 1).

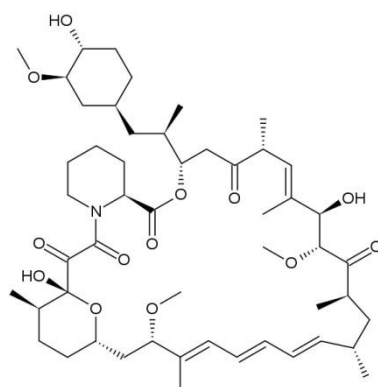


Рис.1 Структурная формула рапамицина

Рапамицин и полученные на его основе химические производные обладают разнообразными биологическими свойствами, широко используемыми в фармацевтике, в основном для получения иммуносупрессивных и противоопухолевых агентов.

Изначально рапамицин использовали в качестве противогрибкового агента, однако широкую известность во всем мире он получил в качестве мощного иммуносупрессанта; кроме того, в настоящее время производные рапамицина широко используются в трансплантологии. Помимо противогрибковых и иммуносупрессивных свойств, рапамицин оказался способен подавлять пролиферацию клеток и ангиогенез у целого ряда злокачественных новообразований. Проведенные *in vivo* исследования показали также, что эукариотическая активация 4E-связывающего белка (фактора инициации трансляции) при помощи рапамицина предотвращает негативное воздействие допаминергетического невроза, типичного при развитии болезни Паркинсона. Помимо вышеописанных эффектов, рапамицин и его производные обладают и другими положительными свойствами, включая стимулирующее воздействие на разрастание нейронных отростков.

Несмотря на широкий спектр возможностей применения рапамицина в медицине, его использование в значительной мере ограничивается низкой продуктивностью существующих природных штаммов-продуцентов, что в результате увеличивает себестоимость субстанции и снижает возможные объемы его промышленного производства.

В связи с этим, задачей данного исследования было получение нового высокопродуктивного штамма *S. hygroscopicus* при помощи многоступенчатого УФ-мутагенеза с последующей селекцией, а также оптимизация состава питательной среды для полученного штамма-продуцента.

В качестве исходного штамма в работе использовали штамм *Streptomyces hygroscopicus* R 13-29, полученный при помощи мутагенного воздействия на типовой штамм *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. Продуктивность штамма R 13-29 составляла 319 мг/л культуральной жидкости. В качестве мутагенного фактора были использованы УФ-лучи с длиной волны, 250-280 нм (лампа Mineralight, мощность 12.5 Вт). Облучение проводили в суспензии в открытой чашке Петри на расстоянии 40 см от лампы. Время экспозиции варьировало от 0 до 25 минут. Культивирование штаммов в жидкой питательной среде осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 50 мл, содержащих 10 мл среды. Культуру выращивали в колбах на качалочной установке “Innova 44” при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см) и температуре 29°C в течение 9 суток.

В процессе данного исследования при использовании метода ненаправленного индуцированного многоступенчатого УФ-мутагенеза и последующей селекции был получен штамм *S. hygroscopicus* R 33-41 с продуктивностью  $655 \pm 5$  мг/л рапамицина, что вдвое превышает продуцирующую способность исходного штамма *S. hygroscopicus* R 13-

29. Вновь полученный штамм R 33-41 имеет повышенную устойчивость к ряду антибиотиков (амфотерицину МИК 1,0 мкг/мл и циклогексимиду МИК>200 мкг/мл), в том числе и к собственному антибиотику - рапамицину (МИК>1000 мкг/мл), а также способность утилизировать некоторые источники углерода (глюкоза и глицерин) в более высоких концентрациях, в отличие от исходного штамма R 13-29.

Проведенная оптимизация состава питательной среды, включающая подбор альтернативных источников углерода, органического и минерального азота, а также макроэлементов и их соотношения, максимально стимулирующего биосинтез рапамицина, обеспечили дополнительное повышение продуктивности штамма R 33-41.

В результате оптимизации питательной среды F1 в соответствии с потребностями штамма R 33-41 была разработана модифицированная питательная среда F2. После разработки оптимизированной питательной среды F2 продуцирующая способность штамма *S. hygroscopicus* R 33-41 при глубинном культивировании в колбах составила  $937 \pm 3$  мг, что значительно превышает аналогичный показатель для известных штаммов-продуцентов.

Таким образом, к настоящему моменту штамм *S. hygroscopicus* R 33-41 является наиболее перспективным для промышленного применения, а также дальнейшей селекции в направлении увеличения продуктивности. На следующем этапе работы с данным штаммом планируется проведение исследований по подбору условий культивирования и оптимальных параметров ферментации в опытно-промышленных и промышленных условиях с использованием модифицированной питательной среды F2.

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ ИЗ ВОДЫ И СЕДИМЕНТОВ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ**

**О.И. Сазонова, А.Б. Гафаров, Н.В. Присяжная, А.А. Иванова, С.Л. Соколов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина Российской академии наук, Пущино

Балтийское море считается одним из морей, экологическое состояние которых вызывает тревогу. Углеводороды нефти поступают в Балтийское море из многих источников, в частности с речным и поверхностным стоком, в результате прямых сбросов из городов, предприятий. Другими важными источниками являются очистка нефтяных

танкеров и умышленные сбросы с судов, а также разливы нефти при авариях (посадка танкеров на мель, случайные выбросы из нефтехранилищ), утечки при разведочных работах и эксплуатации прибрежных платформ. Ликвидация нефтяного разлива на море ставит перед собой цель уменьшить ущерб для экологических и социально-экономических ресурсов. Микробная ремедиация загрязненных углеводородами территорий является доступным и экологически безопасным методом очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Целью данной работы являлось изучение биodeградативного потенциала микробных сообществ в воде и осадках Балтийского моря.

Для исследования разнообразия микроорганизмов - деструкторов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и нефтепродуктов осуществляли отбор проб воды и осадков в зимний период в двух точках Финского залива (д. Кандикюля, порт Усть-Луга). Для выделения микроорганизмов-деструкторов из этих проб использовали минеральную среду с добавлением следующих субстратов в качестве единственных источников углерода и энергии – нефть, дизельное топливо, нафталин, фенантрен или БТЭК (смесь бензола, толуола, ксилолов и этилбензола). Всего в ходе работы всего было изолировано 78 штаммов-деструкторов ПАУ и нефтепродуктов. Из них методом накопительного культивирования – 44 штамма, методом прямого посева – 34 штамма.

Для проверки того, насколько филогенетически близки друг другу выделенные из проб морской воды и осадков Балтийского моря микроорганизмы и к каким популяционным группам они относятся, проводился геномный фингерпринт с использованием праймера BOXA1R. С использованием алгоритма neighbor joining и программы PyEprh 1.4 была получена кластерная дендрограмма, ее анализ показал высокое биоразнообразие выделенных микробных штаммов; ни по одному форм-фактору (место выделения, способ выделения, вода/осадок, ростовой субстрат) не выявлено достоверной кластеризации.

Идентификацию выделенных микроорганизмов-деструкторов проводили, используя систему MALDI Biotyper (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация). Установлено, что в микробных сообществах как воды, так и осадков Финского залива основными представителями являются *Gamma*proteobacteria (например, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) (Табл.1). Однако в отличие от воды, в осадках Финского залива присутствуют *Alphaproteobacteria* (*Brevundimonas* sp., *Ochrobactrum* sp.)

Проба	%	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Proteobacteria</i>			неклассифицированные
				<i>Alpha-</i>	<i>Beta-</i>	<i>Gamma-</i>	
<i>Вода</i>	10,3	5,1	-	10,3	58,9	15,4	
<i>Седимент</i>	5,1	10,3	7,7	15,4	53,8	7,7	

**Таблица 1.** Процентное соотношение различных классов бактерий в исследуемых образцах воды и седиментов Балтийского моря.

У микроорганизмов гены катаболизма различных ароматических углеводов могут локализоваться в составе мобильных генетических элементов, в том числе на плазмидах. Известно, что плазмиды биodeградации моно- и полиароматических углеводов, входящих в состав нефти и нефтепродуктов, чаще всего относятся к группам IncP-9, IncP-7 и IncP-2. Плазмиды группы несовместимости IncP-2 в силу особенностей строения своего репликона не могут быть детектированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), поэтому выделенные штаммы проверялись на наличие плазмид групп несовместимости IncP-9 и IncP-7. Показано, что в трех штаммах присутствуют плазмиды P-9 группы несовместимости, в двух штаммах – плазмиды P-7 группы.

Катехол-2,3-диоксигеназа является одним из ключевых ферментов деградации полициклических и моноциклических углеводов. Считается, что наличие гена катехол-2,3-диоксигеназы (*nahH*) является косвенным свидетельством плазмидной локализации оперонов биodeградации, однако у некоторых деструкторов ПАУ, в частности *P. putida* KF715 и *P. stutzeri* AN10 *nahH* локализован в составе бактериальной хромосомы. Таким образом, проверка штаммов на наличие гена катехол-2,3-диоксигеназы служит дополнительным тестом на содержание в исследуемых штаммах плазмидной ДНК. По результатам ПЦР со специфичными праймерами показано наличие гена катехол 2,3-диоксигеназы у восьми штаммов и возможное его наличие у двух штаммов. В пяти случаях наличие гена катехол 2,3-диоксигеназы коррелирует с наличием *repA* гена плазмид IncP-7 или IncP-9. В остальных случаях не исключено наличие в штаммах

плазмид иных групп несовместимости, либо локализации гена катехол-2,3-диоксигеназы на бактериальной хромосоме.

Данная работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61615X0038.

## **РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДА АПТАМЕРНОГО АНАЛИЗА ОХРАТОКСИНА А НА ОСНОВЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

**А.В. Самохвалов, И.В. Сафенкова**

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Мониторинг загрязнения потребительской продукции (прежде всего – продуктов питания) и окружающей среды токсичными контаминантами требует разработки экспрессных методов их определения. Охратоксин А (ОТА) является низкомолекулярным (404 Да) токсичным метаболитом ряда плесневых грибов, часто контаминирующим различные сельскохозяйственные растения и пищевые продукты: пшеницу, специи, кофе и какао бобы, орехи, сухофрукты, вино. Для его детекции преимущественно используются сложные аналитические методы, реализуемые в стационарных лабораториях, – высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография и иммуноферментный анализ. В связи с этим задачей исследования являлась разработка экспрессного метода определения ОТА, основанного на применении в качестве рецепторных молекул аптамеров – одноцепочечных олигонуклеотидов.

В работе использовали биотинилированный 36-членный ДНК-аптамер: 5'-biotin-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3' (11,7 кДа). Предложенный метод анализа основан на регистрации изменения поляризации флуоресценции флуорофора, возбужденного плоскополяризованным светом, которое происходит при включении флуорофора в межмолекулярные комплексы. Для его реализации синтезировали конъюгат производного ОТА с 4'-(аминометил)флуоресцеином, а непосредственно анализ заключался в конкуренции между свободным (содержащимся в пробе) ОТА и определенным количеством меченого ОТА за ограниченное количество сайтов связывания рецептора. Реакционную смесь возбуждали плоскополяризованным светом с  $\lambda_{ex} = 480$  нм и измеряли флуоресценцию при  $\lambda_{em} = 535$  нм. Принципиальная особенность разработки – впервые предложенное применение

белковых якорей для усиления эффекта деполяризации. В качестве таких якорей использовали стрептавидин (53 кДа) и комплекс стрептавидаина с биотинилированными IgG (>200 кДа). Второй вариант позволил повысить снизить предел обнаружения в 40 раз по сравнению с анализом на основе нативного аптамера. Проведена детекция ОТА в буферной системе, предел обнаружения составил 3 нМ (1.2 мкг/кг), и в обесцвеченном поливинилпирролидоном белом вине, предел обнаружения (с учетом четырехкратного разведения) – 48 нМ (19 мкг/кг). Время анализа 15 мин.

Полученные результаты демонстрируют эффективность для детекции низкомолекулярных соединений предложенной стратегии, позволяющей совместить преимущества поляризационного флуоресцентного анализа и аптамерных рецепторов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-53-45090-ИНД\_а.

## **БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ**

**Д. Е. Сидорова<sup>2</sup>, В. А. Плюта<sup>1</sup>, О. А. Кокшарова<sup>1,3</sup>, А. А. Попова<sup>1</sup>, И. А. Хмель<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва.

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва.

<sup>3</sup> ГУ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва.

Электронный адрес: [misenok1@gmail.com](mailto:misenok1@gmail.com)

Тел.: (499)196-00-16, Факс: (499)196-02-21

В последние годы, при бурном развитии нанобиотехнологии, внимание исследователей привлекла возможность синтеза наночастиц (НЧ) биологическим методом (или методом «зеленого синтеза») с использованием бактерий, грибов, растений и водорослей. Главными проблемами получения НЧ металлов являются стабильность и агрегация НЧ, контроль роста НЧ, морфологии, размера и распределения по размерам. Биологические объекты используются в биосинтезе НЧ не только как восстановители металлов из их соединений, но и как стабилизаторы образующихся НЧ за счет продуцируемых белков, полисахаридов, липидов клеточной стенки и т.д. Этот подход рассматривается как альтернатива имеющимся химическим методам получения НЧ



металлов, в том числе, наночастиц с необычной, уникальной структурой и формой. Метод биогенеза НЧ обеспечивает достаточно дешевую, экологически безопасную, удобную для коммерциализации процедуру получения НЧ металлов. Многие синтезированные таким образом НЧ (например, серебряные, золотые, цинковые и др.) стабильны, характеризуются различными размерами и формой, проявляют антибактериальные, фунгицидные и противоопухолевые свойства. Основным преимуществом использования растительных экстрактов для синтеза наночастиц серебра является их доступность и отсутствие токсичности; экстракты растений содержат широкий спектр метаболитов, в том числе, те которые могут выполнять функцию восстановителей, способствуя образованию НЧ из катионов металлов. Главным механизмом в этом процессе считается восстановление ионов благодаря активным компонентам, встречающимся в растениях, например, терпеноидам, флавонам, альдегидам, кетонам, амидам и карбоновые кислотам.

В настоящей работе мы исследовали способность экстрактов различных растений (ЭР) восстанавливать катионы серебра до наночастиц серебра (НЧС) и их дальнейшее изучение НЧС, а именно их физических свойств и бактерицидного действия. Исследовалась эффективность действия полученных НЧС на подавление формирования биопленок *Escherichia coli* K-12 AB1157. Всего было протестировано 25 экстрактов из растений, обитающих в России: 9 из них были получены из ООО «Реликт», 16 экстрактов были приготовлены в лаборатории из листьев растений собранных поздней весной. Разработан метод наиболее эффективного получения НЧС с использованием ЭР, подобраны соотношения ЭР и  $\text{AgNO}_3$ , а также оптимальные условия эксперимента. Образование НЧС при увеличении времени инкубации раствора в темноте сопровождалось появлением серой, красно- или темно-коричневой окраски, что свидетельствовало об образовании НЧС различных размеров. Повышение температуры от 24 до 37 °С не оказывало однозначного влияния на интенсивность окрашивания раствора. Присутствие в растворе НЧС было подтверждено измерением спектров поглощения на спектрофотометре Shimadzu 3600 – в спектрах присутствовал типичный для НЧС пик поглощения при 390-450 нм. Таким образом, было подтверждено образование НЧС в данных экстрактах. Для дальнейшего изучения были отобраны 8 ЭР, которые способствовали образованию наибольшего количества НЧС. Полученные из отобранных образцов отмытые НЧС были сконцентрированы в объеме 1 мл дистиллированной воды, после чего была определена концентрация образованных НЧС. Проведены исследования размера и морфологии НЧС методами атомно-силовой микроскопии, показано, что экстракты растений обуславливают образование НЧС различного размера – 70% НЧС размером до 20 нм, 25-35% НЧС 20-40 нм и 60-80 нм. У ряда образцов наблюдаются

размеры образованных НЧС, превышающие 100 нм. Предположительно, это агрегаты НЧС. Были также проведены эксперименты по изучению действия НЧС при росте культур бактерий на жидкой среде NB (в пробирках при качании) и на твёрдой среде NB в чашках Петри. НЧС оказывали убивающее действие на штаммы *Escherichia coli* K-12 и *Pseudomonas aeruginosa*, клетки которого были более устойчивы к НЧС. Были проведены исследования действия полученных НЧС на образование бактериальных биопленок штамма *E. coli* K12 AB1157. Показано, что НЧС подавляли формирование биопленок *E. coli* K-12 AB1157.

## **КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРМОУСТОЙЧИВОЙ ЦИАНОБАКТЕРИИ *DESERTIFILUM* SP. ШТАММ IPPAS B-1220 С ВЫСОКИМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ.**

**Синетова М.А.<sup>1</sup>, Болатхан К.<sup>2</sup>, Заядан Б. К.<sup>2</sup>, Миронов К.С.<sup>1</sup>, Куприянова Е.В.<sup>1</sup>,  
Сидоров Р.А.<sup>1</sup>, Скрипник А. Н.<sup>1</sup>, Лось Д.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, 127276  
Москва, Россия

<sup>2</sup> Кафедра биотехнологии, факультет биологии и биотехнологии Казахского  
Национального университета имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Штамм нитчатой цианобактерии IPPAS B-1220 был изолирован из пресного озера Шар-Нуур (Монголия) и охарактеризован с использованием полифазного подхода. Молекулярно-генетический анализ последовательности гена 16S рРНК, морфологии и ультраструктуры клеток показал, что изолированный штамм принадлежит к недавно описанному роду *Desertifilum* (Oscillatoriaceae), широко распространенному на юге Европы и Азии, а также в Африке. Цианобактерии этого рода обитают преимущественно в теплых пресных водоемах или в почвах пустынь. Несмотря на столь широкий ареал обитания, цианобактерии этого рода имеют высокое генетическое сродство: их последовательности 16S рРНК и D1–D1' региона внутреннего транскрибируемого спейсера 16S–23S ITS отличаются только несколькими нуклеотидами. Штамм IPPAS B-1220 характеризуется необычным составом жирных кислот: в его липидах содержатся 16:1<sup>Δ7</sup> and 16:2<sup>Δ7,10</sup> жирные кислоты, редко встречающиеся у цианобактерий. Анализ чернового варианта генома штамма IPPAS B-1220, проведенного с использованием платформы antiSMASH, выявил присутствие по крайней мере 10 кластеров, кодирующих

нерибосомные синтетазы пептидов, поликетид-синтазы, бактериоцины, лантионин-содержащие пептиды. Штамм *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 интенсивно растет (время удвоения 12-14 часов) в широком диапазоне температур 28-40°C и, таким образом, имеет высокий биотехнологический потенциал.

Работы по изучению ростовых характеристик, ультраструктуры и жирнокислотного состава выполнены Синетовой М.А., Скрипник А.Н. и Сидоровым Р.А., были поддержаны грантом Российского научного фонда № 14-14-00904. Работа Болатхан К. и Заядана Б. К. была поддержана грантом Министерства образования и науки Республики Казахстан.

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ ГЛЮКОКИНАЗ У МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

**Н. П. Солнцева<sup>1,2</sup>, О. Н. Розова<sup>1</sup>, И. И. Мустахимов<sup>1,2</sup>, А. С. Решетников<sup>1</sup>, В. Н. Хмеленина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

Метанотрофы – физиологическая группа аэробных бактерий, использующих метан и метанол в качестве источников углерода и энергии (Trotsenko, Murrell, 2008).

Облигатные метанотрофы не способны использовать сахара в качестве ростовых субстратов, хотя геномы этих бактерий содержат последовательности, аннотированные как гены глюкокиназы (*glk*) – фермента, катализирующего фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата. Гены глюкокиназы выявлены у всех секвенированных метанотрофов класса *Gamma*proteobacteria, *Alphaproteobacteria* (кроме родов *Methylosinus* и *Methylocystis*) и филума *Verrucomicrobia*.

Причины облигатной зависимости метанотрофных бактерий от C<sub>1</sub>-соединений, возможно, связаны с неспособностью транспортировать экзогенную глюкозу в клетку. Так, в геноме *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z отсутствуют гены, кодирующие компоненты фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы транспорта углеводов или альтернативную неспецифическую транспортную систему для галактозы, способную переносить глюкозу в бактериальные клетки. Однако вопрос образования эндогенной глюкозы у метанотрофных бактерий остается открытым.

Примечательной особенностью метанотрофов, обладающих геном *glk*, является наличие генов синтеза и деградации сахарозы и/или гликогена (из опубликованных

данных по геномам метанотрофных бактерий следует, что лишь у *Methylocapsa acidiphila* В2 имеется ген глюкокиназы, но отсутствуют гены синтеза гликогена и сахарозы). Ранее было показано, что многие метанотрофы накапливают в клетках сахарозу и гликоген как запасной продукт. Кроме того, *M. alcaliphilum* 20Z накапливает сахарозу в качестве одного из осмопротекторов, а умеренно термофильный метанотроф *Methylocaldum szegediense* О-12 – в качестве термопротектора (Медведкова и др., 2007). У 20Z функционирует амилосахараза, катализирующая перенос гликозильного остатка сахарозы на гликоген или гидролиз сахарозы до фруктозы и глюкозы. Фруктоза далее метаболизируется с участием ранее изученной фруктокиназы (Бут с соавт., 2012). Ген, кодирующий фруктокиназу, либо входит в состав оперона синтеза/деградации сахарозы (*M. alcaliphilum* 20Z), либо, что реже, располагается на хромосоме изолировано (*M. szegediense* О-12). Нами была изучена фруктокиназа из *M. szegediense* О-12 [3]. Также в геномах метанотрофных бактерий обнаружены кластеры генов, кодирующих ферменты биосинтеза и деградации гликогена – гликогенсинтазу, гликогенфосфоорилазу и амило-1,6-глюкозидазу, причем последний катализирует образование из гликогена нефосфорилированной глюкозы.

Таким образом образование свободной глюкозы в клетках может быть результатом деградации сахарозы или гликогена под действием различных ферментов. Исходя из этого, можно предположить, что глюкокиназа участвует в включении образующейся внутриклеточной глюкозы в основной метаболизм. Однако глюкокиназа – не единственный фермент, способный включать глюкозу в дальнейший метаболизм: в геноме небольшого числа метанотрофов, включая *M. alcaliphilum* 20Z, был найден ген, кодирующий предполагаемую глюкозо-1-дегидрогеназу. Данный фермент катализирует превращение нефосфорилированной глюкозы в глюконо-1,5-лактон, вовлекающийся далее в пентозофосфатный путь. Следовательно, для большинства метанотрофов фосфорилирование глюкозы за счет глюкокиназы является единственным способом ее вовлечения в центральные метаболические пути.

В геномах *M. alcaliphilum* 20Z, *M. szegediense* О-12 и большинства метанотрофов присутствует ген АТФ-зависимой глюкокиназы из семейства гексокиназ; однако в геноме *Methylomonas methanica* А12 и некоторых других представителей найдено два гена глюкокиназ: АТФ-зависимая глюкокиназа семейства гексокиназ и полифосфат-зависимая глюкокиназа из РОК-семейства. Ниже представлены характеристики данных ферментов [1, 2]:

1. Глюкокиназа *M. alcaliphilum* 20Z — гомодимер с молекулярной массой субъединицы ~35 кДа; имеет оптимумы активности при рН 9,5–10,0 и температуре 60°C,

однако полностью инактивируется при данной температуре в течение 5 мин. Фермент строго специфичен к АТФ как донору, к глюкозе и глюкозамину, как акцепторам фосфатной группы. Продукт реакции АДФ ингибирует активность фермента ( $K_i$  для АДФ = 2,3 мМ); такие метаболиты, как фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат, ФЕП, пируват, АМФ, ФФн, Фн, цитрат, глицерат, лактат, малат, оксалоацетат не оказывают значительного влияния. Работа фермента зависит от ионов  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ . Активность глюкокиназы подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен ( $K_m$  каж для глюкозы и глюкозамина = 0,28 мМ, для АТФ = 0,3 мМ). Максимальная скорость реакции составила 237 Е/мг белка;

2. Полифосфат-зависимая глюкокиназа из *M. methanica* А12 — мономер с молекулярной массой субъединицы ~30 кДа; имеет оптимумы активности при рН 8,5 и температуре 65 °С, однако прогревания при 55-65°С фермент не выдерживает и полностью инактивируется в течение 5 минут. В связи с термолабильностью фермента и тем фактом, что оптимальная температура для роста штамма *M. methanica* А12 составляет 28°С, дальнейшие измерения проводились при данной температуре. Фермент строго специфичен к полифосфату, с длиной цепи более 3, как донору фосфатной группы. Такие метаболиты, как фруктозо-1,6-бисфосфат, рибозо-5-фосфат, ФЕП, пируват, АМФ, АМФ, Фн, цитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат, малат, оксалоацетат не оказывают значительного влияния на активность фермента. Работа фермента зависит от наличия ионов двухвалентных металлов (относительная активность, %):  $Mg^{2+}$  (100),  $Mn^{2+}$  (80),  $Co^{2+}$  (79,2),  $Cd^{2+}$  (43,9),  $Ca^{2+}$  (13,3),  $Ni^{2+}$  (10). Активность полифосфат-зависимой глюкокиназы при 28°С, рН 8,5 составила 3,78 Е/мг белка, при 65°С, рН 8,5 – 15,45 Е/мг белка;

3. Фруктокиназа *Methylocaldum szegediense* О-12 — мономер с молекулярной массой субъединицы ~34 кДа. Максимальная активность фермента выявлена при рН 8,5 и резко уменьшается при более кислых значениях рН. Температурный оптимум работы фермента составляет 55-60 °С, что коррелирует с термофильной природой штамма. Фруктокиназа – термостабильный фермент: после инкубации при 55° в течение 2 ч остаточная активность составила 50%. Полная потеря активности происходит через 10 мин инкубации при 65°. Фермент строго специфичен к фруктозе, как к акцептору, и нуклеозидтрифосфатам (АТР (100%), ГТР (76 %) и УТР (31,5 %)) как донорам фосфатной группы. Такие метаболиты, как фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат, ФЕП, пируват, АМФ, ФФн, Фн, цитрат, глицерат, лактат, малат, оксалоацетат не оказывают значительного влияния на активность фруктокиназы. Активность фермента зависит от ионов двухвалентных металлов (относительная активность, %):  $Mg^{2+}$  (100),  $Mn^{2+}$  (148),  $Zn^{2+}$  (44),  $Co^{2+}$  (39),  $Ca^{2+}$  (12,5). Активность

фруктокиназы подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен ( $K_{т_{каж}}$  для фруктозы = 0,88 мМ, для АТФ = 0,93 мМ). Максимальная скорость реакции при 55°C, рН 8,5 – 57,6 Е/мг белка.

## МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИНЕРАЛОВ КАРБОНАТНО-СИЛИКАТНЫХ ПОРОД

**Сорокина А.В.<sup>1</sup>, Щербакова Т.А.<sup>2</sup>, Синягина М.И.<sup>3</sup>, Маркелова М.И.<sup>3</sup>, Шарипова М.Р.<sup>1</sup>, Хиляс И.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

<sup>2</sup>ФГУП «Центральный научно-исследовательский институт геологии нерудных полезных ископаемых», Казань, Россия

<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Междисциплинарный центр протеомных исследований, Казань, Россия

Широко распространенные по всему миру минералы карбонатно-силикатных пород характеризуются целым рядом геологических и химических особенностей. Для серпентинита, обогащенного магнием и кремнием ультраосновных или карбонатных пород, свойственно высокое содержание тяжелых металлов никеля, кобальта и хрома [1]. Гидромагнетит и магнезит, возникающие при процессах выветривания массивов ультраосновных пород, также содержат примеси тяжелых металлов. Минеральные породы считаются неблагоприятными местами для развития живых организмов. Однако микроорганизмы благодаря физиологическим, биохимическим и генетическим процессам успешно адаптировались и освоили данные экстремальные ниши [2]. Непосредственная роль микроорганизмов в формировании минералов карбонатно-силикатных пород остается не ясной, однако, колонизация минеральных поверхностей микроорганизмами благодаря продукции экстраклеточных метаболитов способна оказывать влияние на трансформацию минералов [3].

К месторождениям, образовавшимся в древней коре выветривания ультраосновных пород, относится Халиловское (Ю. Урал), где был проведен отбор проб с целью изучения структуры микробного сообщества карбонатно-силикатных минералов, представленных серпентинитом, гидромагнетитом и магнезитом. Для проведения качественного и количественного анализа состава микробных сообществ использовали высокопродуктивное секвенирование фрагментов генов 16S рРНК. Результаты секвенирования показали, что во всех представленных образцах доминируют

представители филума *Proteobacteria*. Однако в случае серпентинита среди *Proteobacteria* преобладающими оказались микроорганизмы класса *Gammaproteobacteria* (семейство *Pseudomonadaceae*), охватывающего несколько научно важных групп бактерий.

В качестве самых многочисленных представителей *Proteobacteria* в гидромагнезите был выявлен класс *Betaproteobacteria* (семейство *Oxalobacteraceae*), включающий в себя облигатных или факультативных аэробных бактерий, которые часто очень разнообразны по биохимическим путям получения энергии.

Среди микробного сообщества магнезита доминировал класс *Alphaproteobacteria* (азотфиксирующие бактерии семейства *Rhizobiaceae*), имеющий в своем составе преимущественно фототрофные виды микроорганизмов.

Доминирующими филумами серпентинита также являются *Bacteroidetes*, представленные не идентифицированными семействами бактерий и *Actinobacteria*, представленные семейством *Micrococcaceae*. Филы *Firmicutes* (среди них *Bacillaceae*), *Acidobacteria*, *Comamonadaceae* и *Actinobacteria* (среди них *Gaiellaceae*) были идентифицированы как доминирующие в гидромагнезите. Сообщество магнезита содержало представителей филума *Planctomyces* (среди них нитрифицирующие *Pirellulaceae*).

Для сравнения полученных метагеномных данных была построена диаграмма Венна, что позволило определить виды микроорганизмов, встречающиеся во всех минералах и уникальные для каждого минерала. Представители рода *Pseudomonas* присутствовали во всех минералах, бактерии родов *Bacillus* и *Delftia* – присутствовали только в серпентините и гидромагнезите, род *Rhizobium* – в серпентините и магнезите, уникальными представителями в серпентините были бактерии рода *Acinetobacter* и в гидромагнезите - рода *Exiguobacterium*.

Только в микробном сообществе гидромагнезита идентифицировали нитрифицирующих архей семейства *Nitrososphaeraceae*, способных благодаря реакциям окисления аммиака обогащать почвы нитратами - хорошо усваиваемой растениями формой азота.

Таким образом, в ходе данной работы впервые было структурно охарактеризовано микробное сообщество минералов карбонатно-силикатных пород с указанием преобладающих семейств, классов, филумов, а также уникальных представителей сообщества, идентифицированных в отдельных минеральных образцах. Предположительно, выявленное сообщество микроорганизмов, способное колонизировать минеральные поверхности благодаря приобретенным механизмам защиты

к стрессовым факторам (устойчивость к тяжелым металлам) может оказывать влияние на процессы трансформации карбонатно-силикатных минералов.

\*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров; поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований РФФИ 16-34-60200 и грантом в рамках программы «УМНИК».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mengoni, A. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil / A. Mengoni, R. Barzanti, C. Gonnelli, R. Gabbrielli, M. Bazzicalupo // Environmental Microbiology. - 2001. - 3 (11) - P. 691-698.
2. Abou-Shanab R.A.I. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale* / R.A.I. Abou-Shanab, P. van Berkum, J.S. Angle // Chemosphere. - 2007. - 68. - P. 360-367.
3. Pal, A. Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman / A. Pal, S. Dutta, P. K. Mukherjee, A. K. Paul // J. Basic Microbiol. - 2005. - 45. - P. 207-218.

#### **ПОЧВЕННЫЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ РОДА *NOSTOC*: МОРФОЛОГИЯ, ФИЛОГЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

**Темралеева А.Д.<sup>1</sup>, Дидович С.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,

Пушино, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия

Благодаря развитию методов молекулярно-генетического анализа установлено, что морфологически описанный род азотфиксирующих цианобактерий *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria), представители которого широко распространены в пресноводных и наземных экосистемах, является полифилетичным (Hrouzek et al., 2005; Rajaniemi et al. 2005a, b; Řeháková et al., 2007; Arima et al., 2012). Почвенные виды *Nostoc* (*N. commune*, *N.*



*punctiforme*, *N. calcicola*, *N. edaphicum* и др.) вошли в большую и хорошо поддерживаемую кладу, определенную как «*Nostoc sensu stricto*» (Hrouzek et al., 2005; Řeháková et al., 2007). Другие виды с *Nostoc*-подобной морфологией были выделены в новые роды *Mojavia* (Řeháková et al., 2007) и *Desmonostoc* (Hrouzek et al., 2013). Так как морфология и филогения *Nostoc* по-прежнему мало изучены, а его биотехнологический потенциал велик (производство водорода, фармакологическая и пищевая промышленность), то целью данной работы стало изучение морфологического и молекулярно-генетического разнообразия почвенных штаммов рода.

**Материалы и методы.** Объектами исследования послужили 15 штаммов цианобактерий рода *Nostoc* (табл.), выделенных из проб каштановых почв и солонцов (Волгоградская область), бурых полупустынных почв (Республика Калмыкия) и серых лесных почв (Московская и Тульская область). Культивирование штаммов проводили на среде BG11 без азота (1% агар, pH=7.0) в климатостате (температура +23–25 °С, свет 60-75 мкмоль • м<sup>-2</sup> • с<sup>-1</sup>, фотопериод 12 ч.). Все изоляты были депонированы в Альгологическую коллекцию ИФХиБПП РАН ACSSI (<http://acssi.org/>). Первичную таксономическую идентификацию штаммов осуществляли с помощью методов оптической микроскопии, наблюдая за морфологией и жизненными циклами (Komárek, 2013). Далее проводили молекулярно-генетический анализ: ДНК выделяли из цианобактериальной биомассы с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США). При амплификации гена 16S рРНК использовали смесь для ПЦР Screen Mix-HS (Евроген, Россия) и описанные праймеры и условия (Flechtner et al., 2002; Strunecký et al., 2010). Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini (Евроген, Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО «Синтол» (Россия). Для филогенетического анализа была составлена выборка последовательностей гена 16S рРНК штаммов родов *Nostoc*, *Desmonostoc* и *Mojavia* из GenBank с *Coleofasciculus chthonoplastes* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) в качестве внешней группы. Выравнивание последовательностей выполняли в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей. Вычисление генетических дистанций проводили в программе MEGA 5.0.

Табл. Список исследованных штаммов цианобактерий рода *Nostoc*

№ п/п	Вид	Штамм ACSSI	Место изоляции (почва, регион)
1	<i>Nostoc</i> sp.	30	Бурая полупустынная, Калмыкия
2	<i>Nostoc punctiforme</i>	35	Солонец, Волгоградская обл.
3	<i>Nostoc punctiforme</i>	37	Солонец, Волгоградская обл.
4	<i>Nostoc</i> sp.	45	Серая лесная, Московская обл.
5	<i>Nostoc paludosum</i>	47	Серая лесная, Московская обл.
6	<i>Nostoc</i> sp.	57	Серая лесная, Московская обл.
7	<i>Nostoc calcicola</i>	82	Светло-серая лесная, Тульская обл.
8	<i>Nostoc</i> sp.	115	Светло-серая лесная, Тульская обл.
9	<i>Nostoc</i> cf. <i>calcicola</i>	155	Каштановая, Волгоградская обл.
10	<i>Nostoc edaphicum</i>	156	Бурая полупустынная, Калмыкия
11	<i>Nostoc punctiforme</i>	160	Солонец, Волгоградская обл.
12	<i>Nostoc</i> sp.	161	Солонец, Волгоградская обл.
13	<i>Nostoc</i> sp.	164	Бурая полупустынная, Калмыкия
14	<i>Nostoc</i> sp.	167	Солонец, Волгоградская обл.
15	<i>Nostoc minutum</i>	168	Каштановая, Волгоградская обл.

**Результаты и обсуждение.** По данным световой микроскопии все изученные штаммы имели *Nostoc*-подобную морфологию. Однако 16S рРНК-анализ показал, что только 13 штаммов из 15 принадлежат кладе *Nostoc sensu stricto* с высоким уровнем статистической поддержки (87%) и могут быть идентифицированы как истинные ностоки (рис.). Внутри данной клады генетические дистанции варьировали от 0 до 2.7%. Генетические различия между видами *Desmonostoc muscorum* и *Mojavia pulchra*, недавно описанными как самостоятельные роды с *Nostoc*-подобной морфологией, и членами клады *Nostoc sensu stricto* составили 1.3-3.6% и 2.9-4.5%, соответственно. Цианобактериальный штамм ACSSI 164, выделенный из бурой полупустынной почвы, и ACSSI 57, выделенный из серой лесной почвы, кластеризовались с почвенным штаммом *Nostoc* sp. из Сенегала.

Все три штамма не принадлежат роду *Nostoc* и должны быть определены в новый род, как и *Nostoc elliposporum* CCAP 1453/15 (рис.).

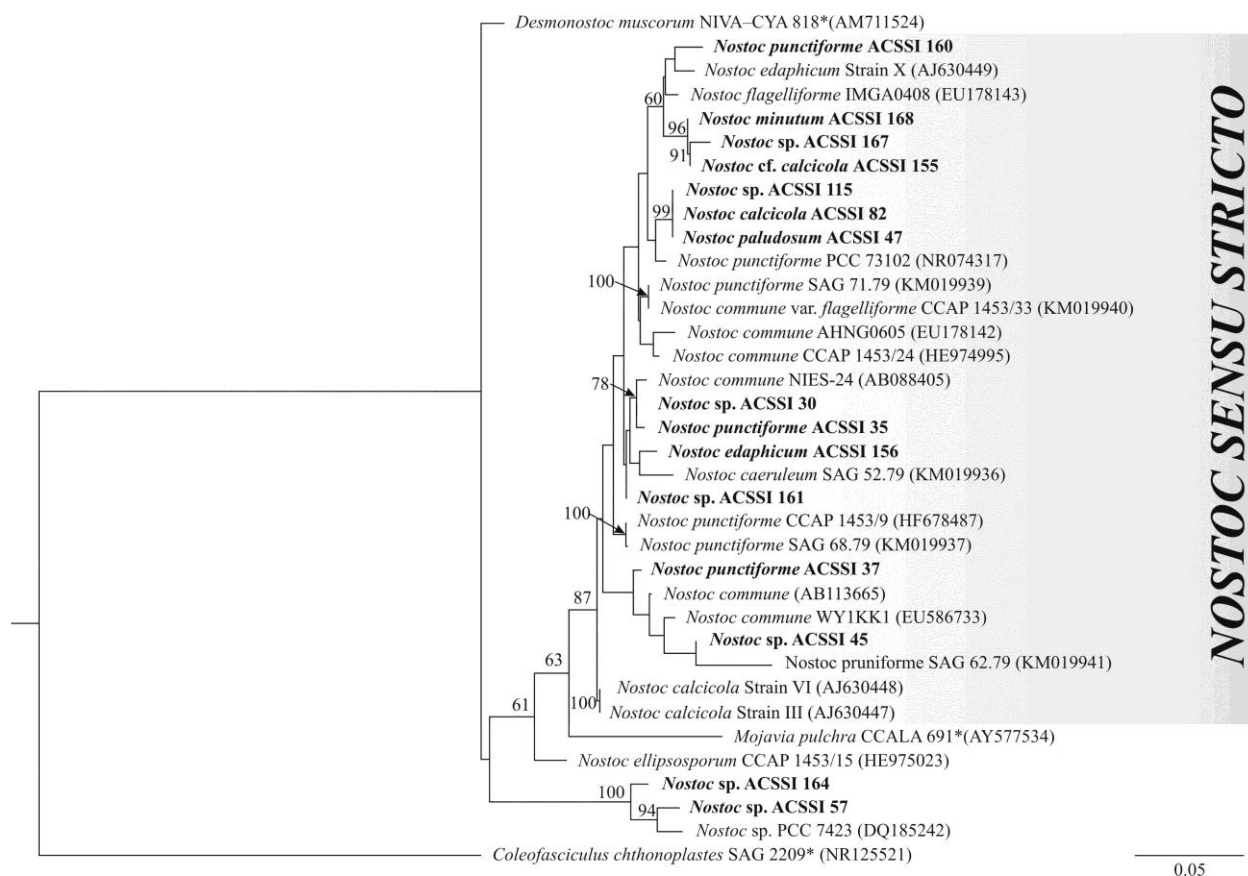


Рис. Укорененное филогенетическое дерево цианобактерий рода *Nostoc*, построенное методом ML, на основе последовательностей гена 16S рРНК (1458 п.н.).

Примечание. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения < 50 % не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR+I+G. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSI, \* – аутентичные штаммы, серым цветом – клада *Nostoc sensu stricto*.

Таким образом, из-за чрезвычайной морфологической изменчивости видов рода *Nostoc*, недостатка надежных диакритических признаков для точной идентификации изолятов и отсутствия аутентичных штаммов в коллекциях культур и референсных нуклеотидных последовательностей в GenBank валидное описание представителей рода затруднительно. Необходима ревизия таксона и переоценка морфологических и молекулярно-генетических критериев разделения видов внутри него.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 15-29-01272 оф\_м.

## НОВЫЙ АНТИБИОПЛЕНОЧНЫЙ АГЕНТ – НИКЛОЗАМИД

**Н. А. Тетенева, М. В. Журина, А. В. Ганнесен, С. В. Мартьянов, В. К. Плакунов**

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, Россия

Биопленки являются преимущественной формой существования микроорганизмов в природе. В большинстве случаев образование биопленок является реакцией бактерий на стрессовые условия (Ножевникова и соавт., 2015).

В составе биопленки бактерии обладают значительной устойчивостью к воздействию неблагоприятных физико-химических факторов среды, а также микробиоцидов. По данным национального института здоровья США 80% хронических инфекций вызвано биопленками патогенных микроорганизмов. Помимо опасности для здоровья человека, биопленки могут образовываться и в различных технологических конструкциях, таких как трубопроводы, что ведет к их коррозии и выходу из строя.

С другой стороны, именно в составе биопленок микроорганизмы осуществляют ряд биотехнологических процессов, в частности, очистку сточных вод. Однако эффективное управление ростом биопленок необходимо и в этом случае.

В настоящее время актуальной проблемой является поиск недорогих, эффективных соединений с антибиопленочной активностью, которые бы могли применяться при терапии инфекций, вызванных биопленками патогенных микроорганизмов, а также в других случаях борьбы с микробными биопленками. К сожалению, большинство описанных до сих пор антибиопленочных агентов являются токсичными для человека (Yang et al, 2014). Поэтому в своей работе мы используем другой подход - поиск веществ с антибиопленочной активностью среди лекарственных средств и пищевых добавок, уже прошедших клинические исследования и доказавших свою безопасность (Мартьянов и соавт., 2014).

Одним из них является никлозамид – противогельминтный и моллюскицидный препарат, способный, по последним данным, подавлять рост бактерий (Imperi et al, 2013; Torres et al, 2016). Нами была показана высокая антибиопленочная активность никлозамида против ряда грамположительных бактерий, занимающих разные экологические ниши. Были исследованы бактерии-нефтеокислители (*Kocuria rhizophila*, *Dietzia natronolimnaea*) и симбионты кожи человека (*Staphylococcus aureus*).

Нами разработан метод, позволяющий оценить количество жизнеспособных клеток в биопленке. Классический метод подсчета КОЕ в случае биопленок дает неудовлетворительный результат, так как клетки заключены во внеклеточный полимерный матрикс, диспергировать который затруднительно. Поэтому колонии вырастают из агрегатов клеток, а часть клеток гибнет при диспергировании. Для определения количества метаболически активных клеток используют краситель бромид 3-(4,5-диметил-2-тиазол)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия (МТТ), который является акцептором электронов в дыхательной цепи. При восстановлении краситель переходит в нерастворимый формазан, количество которого и является показателем числа жизнеспособных клеток. Биопленки выращивали на тефлоновых кубиках или на фильтрах из стекловолокна (Плакунов и соавт, 2016).

В наших экспериментах никлозамид оказался достаточно активным против биопленок грамположительных бактерий. Штаммы-комменсалы человека имеют близкие  $ID_{50}$  (концентрация ингибитора, подавляющая рост на 50% по сравнению с контролем) - от 0,05 до 0,08 мкг/мл. Один из нефтеокисляющих штаммов – *D. natronolimneae* – показал высокую чувствительность к никлозамиду ( $ID_{50}$  0,02 мкг/мл). Другой организм, *K. rhizophila*, напротив, демонстрирует более высокую устойчивость к этому биоциду ( $ID_{50}$  0,17 мкг/мл). Также обнаружен аддитивный эффект никлозамида и азитромицина против биопленок *K. rhizophila* и *S. aureus*.

Таким образом, в ходе наших исследований мы показали эффективность никлозамида как антибиопленочного препарата широкого спектра действия, активного против представителей разных экотопов: симбионтов человека и микроорганизмов-нефтеокислителей. Никлозамид производится в больших количествах, относительно недорог, обладает высокой антибактериальной активностью и не токсичен для организма человека. Полученные результаты позволяют рассматривать никлозамид как перспективный компонент комплексных антибиопленочных препаратов (в сочетании с антибиотиками).

1. Мартьянов С. В., Журина М. В., Эль-Регистан Г. И., Плакунов В. К.. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология, 2015, т. 84, № 1, с. 27–36.
2. Ножевникова А. Н., Бочкова Е. А., Плакунов В. К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии (обзор) // Микробиология. 2015. т.84. № 6. с. 623-644.

3. Плакунов В. К., Мартыянов С. В., Тетенева Н. А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в стационарных условиях // Микробиология, 2016, т. 85, №4, с. 1-6.
4. Imperi F., Massai F., Pillai C.R., Longo F., Zennaro E., Rampioni G., Visca P., Leoni L. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing // Antimicrob. Agent. Chemother. 2013. v. 57. p. 996–1005.
5. Torres N.S., Abercrombie J.J., Srinivasan A., Lopez-Ribot J.L., Ramasubramanian A.K., Leung K.P. Screening a commercial library of pharmacologically active small molecules against *Staphylococcus aureus* biofilms // Antimicrob. Agents Chemother. 2016. p. AAC.00377-16. [Epub ahead of print].
6. Yang S., Abdel-Razek O.A, Cheng F., Bandyopadhyay D., Shetye G.S, Wang G., Luk Y.Y. Bicyclic brominated furanones: a new class of quorum sensing modulators that inhibit bacterial biofilm formation // Bioorg. Med. Chem. 2014. v.22. p. 1313–1317.

## СУЛЬФИТ-ИОН ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) КАК ГИПОТЕТИЧЕСКИЙ АНТИОКСИДАНТ В АЭРОБНО РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI*

**В.Ю. Ушаков<sup>1,2</sup>, Г.В. Смирнова<sup>2</sup>, О.Н. Октябрьский<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия.

<sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Активные формы кислорода (АФК) образуются как при нормальном росте бактерий в следствие одноэлектронного восстановления кислорода в дыхательной цепи, так и при действии ряда факторов (антибиотики, осмотический шок, резкое изменение температуры и др.). Известно, что в клетке супероксидный радикал ( $\text{O}_2^-$ ) и его производные ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ) подвергаются ферментативной утилизации каталазами и супероксиддисмутазами. Кроме того, существуют низкомолекулярные агенты антиоксидантной защиты, такие как тиолы (глутатион, тиоредоксин), убихиноны, токоферолы и др. Показано, что мутанты по обеим цитоплазматическим супероксиддисмутазам не растут в отсутствие цистеина, поскольку их мембрана становится проницаемой для сульфита ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), являющегося промежуточным продуктом при синтезе цистеина. Вытекание сульфита обычно рассматривается как результат

окислительного повреждения мембран, однако сульфит обладает высокой восстановительной активностью и может вступать в реакцию с пероксидами в среде и периплазме, способствуя их нейтрализации. Целью данной работы было показать предположительную антиоксидантную активность сульфит-иона.

В качестве объекта исследований использовали бактерии *E. coli* BW25113 родительского типа и делеционные мутанты по генам, кодирующим первый фермент синтеза глутатиона JW2663(*gshA*), супероксиддисмутазу JW1638 (*sodC*), JW3879 (*sodA*), менахинон JW3901 (*menA*), каталазу HPI JW3914 (*katG*), а так же двойной мутант NM451 (*sodCgshA*).

Минимальная концентрация сульфита при нормальном аэробном росте была обнаружена в среде культивирования бактерий родительского типа ( $0.49 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ). В других исследуемых штаммах *E. coli* базовый уровень  $\text{SO}_3^{2-}$  зависел от характера мутации: от  $0.96 \pm 0.03 \mu\text{M}$  у *E. coli gshA* до  $1.87 \pm 0.07 \mu\text{M}$  у двойного мутанта *sodCgshA*. Концентрация сульфита в мутантах *sodC* и *menA* составляла  $1.05 \pm 0.03 \mu\text{M}$  и  $1.13 \pm 0.03 \mu\text{M}$ , соответственно. Таким образом, дефицит GSH и периплазматической SOD способствовал ускоренному вытеканию сульфита из клеток, что может быть как следствием повышения проницаемости мембран, так и потенциальной стратегией защиты бактерий от действия АФК, поскольку  $\text{SO}_3^{2-}$  является сильным восстановителем.

Было обнаружено дозо-зависимое снижение уровня внеклеточного сульфита (концентрация сульфита представлена как отношение  $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ ): 4.2, 3.6 и 3.1 на 70 минуте инкубации бактерий wt с 100  $\mu\text{M}$ , 1 мМ и 2 мМ перекиси водорода, соответственно.

Для проверки предположения о потенциальных антиоксидантных свойствах сульфита, были проведены эксперименты с предобработкой растущих клеток *E. coli*  $\text{SO}_3^{2-}$  (100  $\mu\text{M}$ ) и последующей обработкой эквимолярной концентрацией  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0.1 мМ менадионом. Защитное действие экзогенного  $\text{SO}_3^{2-}$  при действии  $\text{H}_2\text{O}_2$  было обнаружена только у штамма, дефицитного по каталазе HPI (*katG*). Обработка бактерий  $\text{SO}_3^{2-}$  (100  $\mu\text{M}$ ) перед внесением менадиона достоверно защищала клетки у всех изученных штаммов.

Культивирование бактерий wt и *gshA* в присутствии экзогенного  $\text{O}_2^-$  приводило к достоверному повышению концентрации  $\text{SO}_3^{2-}$  на 20% у бактерий *gshA* по сравнению с клетками родительского типа.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-00762 и программой УрО РАН №15-4-4-16.

***THERMOSULFURIMONAS LITORALIS*, SP.NOV. – НОВАЯ, АНАЭРОБНАЯ  
ТЕРМОФИЛЬНАЯ СЕРО-ДИСПРОПОРЦИОНИРУЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ  
МЕЛКОВОДНЫХ МОРСКИХ ГИДРОТЕРМ**

**Фролова А.А., Слободкина Г.Б., Слободкин А.И.**

ФИЦ Биотехнологии РАН

Микробное диспропорционирование неорганических соединений серы - это хемолитотрофный процесс, где такие вещества, как элементарная сера, тиосульфат или сульфит служат одновременно и донорами, и акцепторами электронов, в результате чего происходит образование сероводорода и сульфата, как конечных продуктов. Термофильные серо-диспропорционирующие микроорганизмы представляют собой филогенетически разнообразную группу и относятся к классам *Thermodesulfobacteria* и *Deltaproteobacteria*. Известные к настоящему времени серо-диспропорционаторы выделены либо из глубоководных морских гидротерм, либо из наземных горячих источников.

Из мелководных морских гидротерм о-в Кунашир нами выделена термофильная, анаэробная бактерия (штамм SU872), диспропорционирующая соединения серы. Клетки штамма SU872 представляют собой подвижные, грамм-отрицательные овальные или короткие палочки. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S RNA штамма SU872 показал 97,8% сходства с типовым штаммом *Thermosulfurimonas dismutans*. ДНК-ДНК гибридизация штамма SU872 и типового штамма *Thermosulfurimonas dismutans* составила 48%.

Штамм SU872 растет при температуре от 50 до 79°C с оптимумом роста 74°C. Оптимальное значение pH – 7,0, при значениях pH 4,0 и 8,5 роста не наблюдается. Оптимальные значения солености 1,5 – 4,5 %, при значениях солености 0,5 и 5,5 рост отсутствует. Штамм SU872 растет хемолитоавтотрофно за счет диспропорционирования элементарной серы, тиосульфата или сульфита; единственным источником углерода служит CO<sub>2</sub>/бикарбонат. Сульфат не используется в качестве акцептора электронов. Различные органические субстраты, такие как пептон, пируват, формиат, лактат, ацетат, метанол, этанол, бутират, не используются в качестве доноров электронов с элементарной серой в качестве акцептора электронов.

На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа мы предлагаем отнести штамм SU872 к новому виду рода *Thermosulfurimonas*,



*Thermosulfurimonas litoralis* sp. nov. *Thermosulfurimonas litoralis* – первый серо-диспропорционирующий микроорганизм, выделенный из мелководных морских гидротерм.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.

Д. И. Хватов<sup>1</sup>, О. И. Верная<sup>2</sup>, В.П. Шабатин<sup>2</sup>, А.М. Семенов<sup>1</sup>, Т.И. Шабатина<sup>2</sup>,  
А.Н. Бородина<sup>2</sup>, М.А. Марков<sup>2</sup>

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет - 1, Химический факультет – 2, Москва, Россия.

Снижение эффективности антимикробных лекарственных средств из-за образования резистентных бактериальных штаммов является острой проблемой. Модифицирование применяемых в клинической практике молекул антибактериальных лекарственных средств (ЛС) наночастицами (НЧ) тяжелых металлов, а также получение новых полиморфных форм этих молекул с помощью метода криомодификации проводится с целью возможного усиления антибактериального действия, а, следовательно, и продления эффективного использования таких ЛС. Полученные молекулы ЛС, у которых обнаружены изменения физико-химических свойств (таких как, химический состав композиций, кристаллическая структура, размер молекулярных агрегатов) по сравнению со свойствами исходных молекул требуют проверки на возможное изменение антибактериальной активности (АА). В исследовании модифицированию подвергали ЛС: диоксидин, гентамицин, метронидазол. Антибактериальную активность полученных модификаций определяли диско-диффузионным методом с получением значений диаметров зон задержки роста (ЗЗР) и кинетическим методом с определением константы ингибирования ( $K_i$ ) действующего вещества на рост микроорганизма. Испытания модифицированных ЛС проводили на бактериях *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium cyaneum*. При проведении диффузионных опытов в качестве носителя ЛС использовали диски из фильтровальной бумаги и криосинтезированные полимерные гели, изготовленные на основе хитозана, альгината и альбумина. Выявлены различия в действии ЛС в отношении перечисленных микроорганизмов. На действие модифицированных ЛС, как и на действие исходных ЛС оказывают влияние такие факторы как концентрация раствора ЛС, тип металла, которым нагружается ЛС, метод получения НЧ металла, тип носителя ЛС. Определение

кинетических характеристик ( $K_i$ ) действия ЛС на более широком спектре микроорганизмов позволит выявить механизмы действия модифицированных ЛС.

Работа при поддержке гранта РФФИ № 16-13-10365.

## **ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ИНДУКЦИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ.**

**Т. А. Чуприянова<sup>2</sup>, В. А. Плюта<sup>1</sup>, И. А. Хмель<sup>1</sup>, А. А. Попова<sup>1</sup>, В. А. Липасова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И.

Менделеева, Москва

Электронный адрес: [tanya.chuprianova@gmail.com](mailto:tanya.chuprianova@gmail.com)

Тел.: (499)196-00-16, Факс: (499)196-02-21

В настоящее время большой интерес исследователей вызывает способность микроорганизмов синтезировать летучие органические соединения (ЛОС). Обнаружено более 1000 ЛОС, выделяемых микроорганизмами; структура многих из них не определена. Показано, что многие ЛОС подавляют рост микроорганизмов, в том числе, фитопатогенных, и модулируют рост растений, подавляя или стимулируя его. ЛОС, синтезируемые бактериями, характеризуются низкой молекулярной массой (<300 Дальтон) и высоким давлением паров. Механизмы действия ЛОС на клетки организмов в настоящее время мало известны. ЛОС могут быть использованы как вещества с антибактериальным действием; могут быть средством коммуникации бактерий, сигнальными молекулами («*infochemicals*»); могут быть использованы как средства биоконтроля против фитопатогенных организмов.

В настоящей работе было исследовано действие ЛОС, образуемых в наибольшем количестве ризосферными штаммами родов *Pseudomonas* и *Serratia*, на ответ бактерий на окислительный стресс. А именно, исследовалось действие ЛОС (2-ундеканон, 2-нонанон, 2-гептанон и диметилдисульфид), на экспрессию генов *katG*, *soxS* и *oxyS*, продукты которых участвуют в защите клеток от окислительного стресса. ЛОС синтезируемые штаммами родов *Pseudomonas* и *Serratia* были определены методом газовой

хроматографии и спектрометрии (в совместной работе с сотрудниками Иерусалимского университета в Израиле).

Окислительный стресс у бактерий может быть вызван действием таких соединений, как перекись водорода, паракват, а также некоторыми антибиотиками. При окислительном стрессе образуются активные формы кислорода (АФК), включающие перекись водорода ( $H_2O_2$ ), супероксид анион-радикал ( $O_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $OH^\cdot$ ) и др., которые могут вызывать повреждение многих клеточных компонентов - липидов, ДНК, белков и др. Клетки бактерий защищаются от окислительного стресса, индуцируя синтез ряда ферментов, разлагающих АФК - каталаз, пероксидаз, супероксиддисмутаз и др. Ответ бактериальных систем на окислительный стресс регулируется глобальными регуляторами транскрипции. Белок OxyR контролирует транскрипцию группы генов, в состав которых входят *katG* (кодирует каталазу), *oxyS* (кодирует небольшую, регуляторную РНК), и др. Под контролем белков SoxRS находится индукция экспрессии генов, отвечающих на супероксидный стресс.

В работе были использованы специфические *lux*-биосенсоры, отвечающие на экспрессию генов *katG*, *soxS*, *oxyS*. Сенсорами были клетки *E. coli* MG1655, несущие плазмиды с клонированными промоторами указанных генов и репортером *lux*-опероном; *lux*-оперон транскрибировался с промоторов генов *katG*, *soxS*, *oxyS*. Степень экспрессии соответствующих промоторов определялась по интенсивности биолюминесценции. Биосенсоры были предоставлены д.б.н. Завильгельским Г.Б. (ВНИИгенетика). Индукторами окислительного стресса (в качестве положительного контроля) были перекись водорода и паракват. Было показано, что исследуемые ЛОС не вызывают окислительный стресс (индукцию  $P_{KatG}$ ,  $P_{soxS}$ ,  $P_{oxyS}$  -промоторов). При предварительной обработке культуры биосенсора данными соединениями подавляется последующая индукция окислительного стресса, вызываемая перекисью водорода или паракватом.

Также в работе было исследовано, могут ли ЛОС, синтезируемые бактериями, изменять чувствительность бактерий к антибиотикам. Известно, что некоторые антибиотики могут вызывать окислительный стресс у бактерий.

По результатам исследований действия ЛОС на изменение чувствительности клеток *E. coli* K12Sstr-r к антибиотикам с различными механизмами действия (гентамицин, ампициллин, ципрофлоксацин) в случае совместного действия гентамицина с 2-нонаноном и гентамицина с ДМДС наблюдается повышение устойчивости клеток к действию антибиотика. Напротив, при совместном действии кетонов и ципрофлоксацина

выживаемость клеток снижалась. При совместной обработке клеток ампициллином с кетонами и ДМДС ЛОС слабо влияли на устойчивость клеток к антибиотику.

## ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ РОДА *NOSTOC* SP. (CYANOBACTERIA)

**Шалыгина Р.Р.<sup>1</sup>, Шалыгин С.С.<sup>2,3</sup>, Редькина В.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН, г. Апатиты

<sup>2</sup>Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина, г. Апатиты

<sup>3</sup>John Carroll University, USA

*Nostoc* sp. Vauch. ex Born. & Flah широко распространенный род цианобактерий, образующий множественные трихомы в общем чехле, встречающийся в различных местообитаниях, способен к кислородному фотосинтезу и фиксации азота. Видовую идентификацию штаммов крайне сложно осуществить, основываясь на морфологии, так как род характеризуется наличием морфологически сходных признаков, различными жизненными стадиями в зависимости от условий среды, изменениями морфологии в культуре. В решении проблемы таксономической принадлежности вида рода *Nostoc* могут помочь молекулярно-генетические методы исследования, такие как изучение фрагмента гена 16S рРНК. Но даже эта методика может дать неразрешенные деревья с политомиями и раскрывает в основном лишь родовую принадлежность изучаемых штаммов, поэтому для выявления видовой принадлежности необходимо привлечение других генов, например, используют в анализе вторичную структуру участка гена 16S-23S ITS, а также, по возможности, привлекают мультилокусный анализ с использованием генов 23S rRNA, 5S, *rbcLX*, *rpoC1*, *rpoB*, *Nif*-family. Однако, необходимо совместное изучение морфологии, экологии, жизненного цикла штаммов. Использование всех этих методов есть полифазный подход, который на сегодняшний момент является современным методом видовой идентификации.

На Кольском полуострове представители рода *Nostoc* нами были обнаружены в почвах, на отвалах нефелиновых песков, на камнях и в эфимерных водоемах. Из образцов были выделены штаммы из смешанной жидкой культуры в чистую культуру методом многократного пересева. Культуру выращивали на жидкой питательной среде Z8 (Kotai, 1972). Из чистых культур была выделена ДНК, проведена ПЦР фрагмента

последовательности гена 16S-23S ITS rRNA, затем клонирование. Плазмиды были отправлены на секвенирование в компанию Functional Biosciences, Inc. (Madison, WI).

Полученные предварительные молекулярно-генетические исследования (филогенетические деревья по участку гена 16S рНК и построение вторичной структуры 16S-23S ITS), а также изучение морфологии, экологии позволяют предположить наличие новых видов.

## ТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВИРУС-ЗАРАЖЕННЫХ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ, ОБРАБОТАННЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫМ АГЕНТОМ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

**Р. Шах Махмуд<sup>1,2</sup>, В. В. Ульянова<sup>1</sup>, М. И. Маркелова<sup>1</sup>, О. С. Козлова<sup>1</sup>, А. Мостафа<sup>2,3</sup>,  
О. Н. Ильинская<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup>Институт медицинской вирусологии университета им. Юстуса-Либига, Гиссен,  
Германия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр, Каир, Египет

Внеклеточная рибонуклеаза (биназа) из бактерий *Bacillus pumilus* давно известна благодаря разнообразным биологическим эффектам. Фермент ингибирует размножение ряда РНК-содержащих вирусов таких как, вирус бешенства, ящура и сезонного гриппа А и В с уменьшением смертности лабораторных животных. Ранее нами было показано подавляющее действие биназы на пандемический вирус гриппа А (H1N1) в культуре клеток эукариот. Для разработки потенциального противовирусного препарата на основе бактериальной рибонуклеазы биназы необходимо установить механизм действия биназы на культуре эукариотических клеток. Целью настоящей работы явилось полнотранскриптомное профилирование вирус-зараженных и биназа-обработанных клеток для обнаружения ключевых транскриптов, изменяющих свой уровень под действием биназы в зараженных клетках.

В исследовании были использованы клетки MDCK (эпителиальные клетки почки кокер спаниеля) и пандемический вирус гриппа А (H1N1), любезно предоставленный профессором С. Плешка из Института медицинской вирусологии Гиссенского

университета (Германия). Для установления цитотоксического действия биназы по отношению к клеткам MDCK и действия биназы против вируса гриппа А (H1N1) использовали метод МТТ и фокус-метод, соответственно. Действие биназы на капсид-защищенные и незащищенные РНК вируса анализировали методом ОТ-ПЦР, действие на вирусные в-, м-, кРНК - методом удлинения праймеров. С использованием системы обратной генетики на основе плазмиды, в которой ген NS вируса гриппа А заменен на ген зеленого флуоресцентного белка, и 4-х плазмид-помощниц, кодирующих PA, PB1, PB2 и NP гены вируса гриппа, было установлено действие биназы на полимеразный комплекс вируса гриппа А (H1N1). Полный транскриптомный анализ обычных, зараженных и биназа-обработанных вирус-зараженных клеток проводили с использованием секвенатора следующего поколения «5500x1 SOLiD wildfire» («Life technologies», США). Библиотеку образцов готовили по инструкции производителя. При биоинформатической обработке данных использовали общедоступные программы «Cufflinks», «TopHat» и программное обеспечение «LifeScope Genomic Analysis Software» («Life technologies», США).

Установлено, что концентрация биназы 100 мкг/мл не является токсичной по отношению к клеткам MDCK при инкубации в течении 24 ч. Показано, что при добавлении в культуральную среду MDCK 10 мкг/мл биназы титр вируса уменьшался на 21%. Показано, что биназа не деградировала сегмент РНК, кодирующий NS белок вируса гриппа А (H1N1), защищенный капсидом, но разрушала NS сегмент РНК, не защищенный капсидными белками. Обнаружено, что уровень вирусных в-, м- и кРНК был снижен на 40%, 56% и 42% под действием биназы. Результаты, полученные с использованием системы обратной генетики, показали, что биназа в 10 раз уменьшает экспрессию генов полимеразного комплекса вируса гриппа А (H1N1). При анализе полного транскриптома незараженных, зараженных и биназа-обработанных клеток MDCK из исходных 21845 транскриптов анализировали 310 значимых. Установлено, что из 41 транскрипта, продукты которых вовлечены в биологические процессы, 20, 18, 14, 12 и 8 транскриптов участвуют в ответе на стимулы, в метаболических процессах, биологической регуляции, взаимодействии с другими организмами и межклеточной коммуникации, соответственно. По молекулярным функциям 41 транскрипт делится на группы по 15, 15, 8, 7, 7, 7 транскриптов, участвующих в связывании белков, ионов, нуклеиновых кислот, нуклеотидов; имеющих гидролитическую и трансферазную активности, соответственно. Из всех значимых транскриптов названия генов определены для 42 транскриптов с помощью базы данных NCBI и для 32 транскриптов с помощью базы Ensemble, для остальных транскриптов установлены локусы. Установлено, что 26 транскриптов имеют

повышенный уровень регуляции (up-regulation) при заражении вирусом, и при обработке зараженных клеток биназой их уровень частично или полностью возвращается к исходному положению. Индукция экспрессии 4 транскриптов длиной 554, 268, 215 и 222 п.о., расположенных на 1, 8, 27 и 31 хромосоме, соответственно, происходит в геноме MDCK при заражении вирусом, которые при обработке клеток биназой снижаются в 1897,0; 12,5; 11,2 и 6,5 раз. Экспрессия единственного транскрипта с размером 259 п.о. в положении 46439861-46440120 хромосомы 5 после индукции при заражении клеток вирусом не подавляется полностью под действием биназы, а только в 2,3 раза. Обнаружено 10 аннотированных транскриптов, которые играют ключевую роль при вирусном заражении. Подавление данных транскриптов под действием биназы повышает клеточный иммунный ответ. Таким образом, биназа помимо прямого действия на геном вируса в зараженных клетках, косвенно стимулирует клеточный иммунный ответ, активируя образование ключевых мембранных противовирусных, макрофаг- и интерферон-активирующих транскриптов. Данное исследование является предпосылкой для установления новых противовирусных мишеней в лечении гриппа и получения новых эффективных противовирусных препаратов.

## **ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПОЧВЕННОЙ САПРОФАГИЧЕСКОЙ МЕЗОФАУНЫ**

**А.В. Якушев**

Факультет почвоведения МГУ, Москва, Россия

Классификация микробных сообществ остаётся актуальной задачей почвенной микробиологии вообще, а не только изучения зоомикробных взаимодействий в почве. Классификация систематизирует общие и индивидуальные черты микробных сообществ и выявляет их связи со свойствами почв. Это важно для биоиндикации. Задача классификации решается 1. при метагеномном исследовании почв и кишечных сообществ, 2. при исследовании функционирования микробных комплексов в кишечнике беспозвоночных животных, например при анализе спектра ферментативной активности почв. Так же эту задачу решает направление, которому посвящена работа – это экофизиологическая характеристика сообществ, например по спектру потребления субстрата. Исследование экофизиологических особенностей конкретных микроорганизмов занимают давно и широко во всём мире. По существу эти исследования представляют собой аутоэкологическую характеристику изучаемых

микроорганизмов. Как правило, проводится исследование *in vitro* (в лабораторных условиях) в градиенте силы влияния абиотических (поллютанты, температура и т.д.) и биотических (антибиотики, токсины, биологические жидкости и т.д.) на те или иные кинетические (ростовые) характеристики микроорганизмов. Исходя из найденной зависимости «доза-эффект» определяется оптимум и пессимумы изучаемых биометрических параметров микроорганизмов (максимальная удельная скорость роста, урожайность микроорганизмов на среде, радиальная скорость роста колоний и т.д.). Термин «экофизиология сообщества микроорганизмов» напротив не распространён в научном мире и не имеет чётко определения. Под экофизиологической характеристикой микробного сообщества мы понимаем определение: его физиологического разнообразия, физиологического состояния его членов, преобладающей среди членов микробного сообщества экологической стратегии, установление состава физиологических групп микроорганизмов.

Цель работы – дать экофизиологическую характеристику кишечных сообществ по ряду кинетических параметров и установить возможности методов математической обработки данных: метода главных компонент, дискриминантного анализа, дисперсионного анализа для классификации микробных сообществ только по одному из экофизиологических параметров:  $Y$  - урожайность ассоциаций микроорганизмов на питательных средах. Эти параметры в работе определяются комплексным структурно-функциональным методом устанавливающим кинетические параметры жидких смешанных культур, формирующихся после инокуляции почвенной суспензией набора селективных сред. Наша рабочая гипотеза - полученные в лаборатории данные по росту этих ассоциаций отражают экофизиологические особенности микробных сообществ непосредственно в природе. Микробиологическим объектом исследования был выбран один из важнейших для почв грибной и бактериальный гидролитический блоки. Поэтому в качестве селективных были выбраны среды с антигрибными (нистатин, цилогексемид) или антибактериальными (хлорамфеникол) антибиотиками, содержащие в качестве единственного источника углерода полисахариды: крахмал, пектин, целлюлозу, хитин, инулин, агарозу, ксилан, декстран; аналог жиров: твин 20; нуклеиновую кислоту; белки: казеин, кератин. Рост ассоциаций на полимерах принимался аналогичным росту чистой культуры и описывался новой авторской математической «комплексной моделью периодической культуры», разработанной для чистой культуры микроорганизмов. Развитие ассоциаций характеризовалось параметрами этой модели. Величины кинетических параметров ассоциаций полагаются пропорциональными значениям кинетических параметров членов микробного сообщества непосредственно в почве.



Модель оперирует параметром среды  $s_0$  – начальной концентрацией ростового субстрата  $s$  (г/л) и параметрами культуры:  $x_0$  – начальное значение концентрации культуры  $x$  в питательной среде;  $t_{\text{лаг}}$  – значение времени  $t$  когда кончается лаг-период в развитии культуры ч;  $\mu_m$  – максимальное значение удельной скорости роста  $\mu$ , ч<sup>-1</sup>;  $\rho_0$  – начальное значение переменной физиологического состояния растущей культуры  $\rho$ ;  $\gamma = 100 + \ln(\rho_0)$  – метаболическая готовность культуры к росту на питательной среде; константа полунасыщения (г/л)  $K_\rho = s$  при  $\rho = 0.5\rho_m$ , где  $\rho_m = 1$  – максимальное значение  $\rho$ ;  $Y$  – экономический коэффициент роста микроорганизмов на пищевом субстрате,  $Y = (x_m - x_0)/s_0$ , где  $x_m$  – максимальная концентрация культуры;  $a_m$  – максимальная удельная скорость отмирания, ч<sup>-1</sup>;  $\tau_{\text{отм}}$  – время начала экспоненциального отмирания, ч;  $\eta_0$  – значение переменной физиологического состояния  $\eta$  отмирающей культуры в момент начала экспоненциального отмирания.

При  $t < \tau_{\text{отм}}$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x; \mu = \mu_m \rho \frac{s}{K_s + s}; \frac{ds}{dt} = -\frac{\mu x}{Y}; \frac{d\rho}{dt} = \mu_m \rho \left( \frac{s}{K_\rho + s} - \rho \right)$$

При  $t \geq \tau_{\text{отм}}$

$$\frac{dx}{d\tau} = -ax; \frac{da}{d\tau} = -a_m \eta; \frac{d\eta}{d\tau} = -a_m \eta (1 - \eta)$$

Экологическую стратегию ассоциаций мы количественно определяем по величинам параметров  $\mu_m$ ,  $K_\rho$ ,  $\mu_m/K_\rho$ ,  $Y$ ,  $a_m$ ,  $\eta_0$ , характеризующие разные участки кривой роста и отмирания периодической смешанной культуры. В данной работе мы сконцентрировали внимание на параметр  $Y$ .

Микробиологическими объектами исследования выступали грибные и бактериальные аэробные, факультативно - анаэробные сапротрофные комплексы, культивируемые на традиционных питательных средах. Непосредственным объектом исследования были корм, содержащее кишечника (транзитное кишечное сообщество) и свежие (суточные) экскременты сапротрофных двупарноногих многожек *Cylindroiulus caeroleocinctus* (Москва), *Pachyiulus flavipes* (Симеиз, Крым) *Orthomorpha* sp.1, *Thyropygus* sp. 1, неописанный вид отряда *Spirobolida* (национальный парк Вьетнам). Изучались так же корм (почва или компост в которой содержались животные) и копролиты различных экологических групп дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* (эндогейный), *Eisenia foetida andrei* (эпигейные) и *Lumbricus terrestris* (эпи-эндогейные). Так же исследовались экскременты личинок комаров-толстоножек (сем. Bibionidae, род *Bibio* sp.) и их корма – опада широколиственных пород деревьев. В качестве дополнительных объектов

сравнения использовались данные, полученные при анализе микробных сообществ различных почв.

Анализ данных методом главных компонент показал (рис.1), что по  $Y$  (урожайность бактериальных ассоциаций на средах) микробные сообщества разделяются только по 2-м достоверным закономерностям, объясняющим суммарно 40-60% дисперсии. 1-ая: чем больше главная компонента 1, тем ниже среднее арифметическое значение  $Y$  ( $r=-0,95$ ) - показатель функционального биоразнообразия микробных сообществ. При этом кишечное сообщество многоножек занимает крайнее левое положение, что указывает на наибольшее функциональное разнообразие гидролитического блока именно в кишечнике по сравнению с другими почвенными сообществами. 2-ая: чем больше главная компонента 2, тем больший стресс испытывает МС (в первую очередь - дефицит влаги).

В целом, однофакторный дисперсионный анализ показал, что  $Y$  на всех средах реагирует на фактор (принадлежность микробных сообществ к определённой почве) значимо ( $p<0,05$ ) и сильно (частная  $\eta^2 >0,5$ ). Дискриминантный анализ параметра  $Y$  на 12 средах характеризующих 200 МС, из 60 классов позволяет подтвердить априорную классификацию со 100% точность около 70% МС (рис.2).

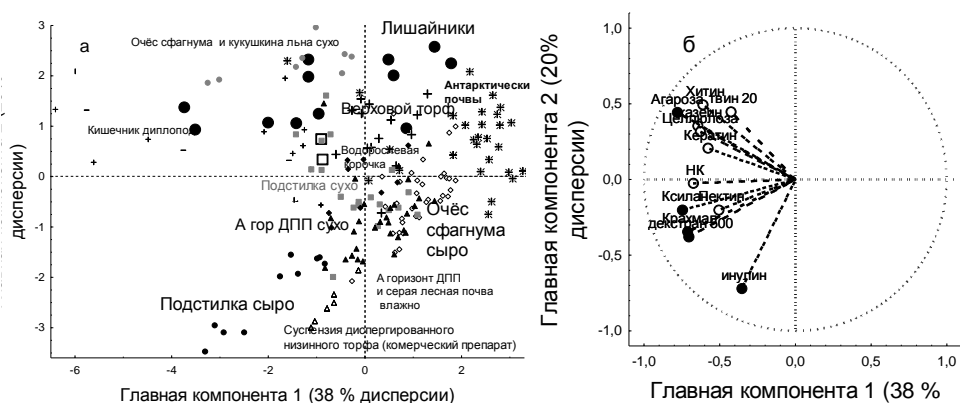


Рисунок 1. Классификация (ординация) микробных сообществ по параметру  $Y$  методом главных компонент; (а) - проекция сообществ на плоскость, образованную 1-ой и 2-ой главными компонентами; (б) - коэффициент корреляции ( $r$ ) между  $Y$  на средах и главными компонентами

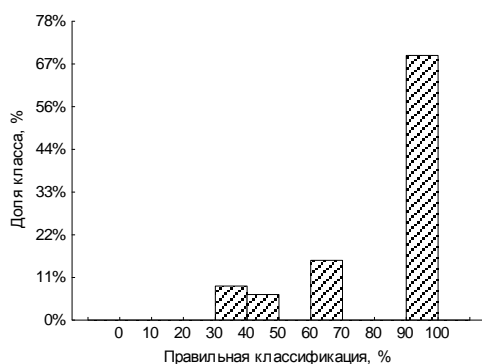


Рисунок 2. Распределение частот встречаемости различных процентов правильной классификации в дискриминантном анализе.

Физиологическое разнообразие (доля от суммарного потребления полимеров) гидролитического комплекса бактерий для корма и копролитов дождевых червей не изменяется, а для кивсяков снижается в экскрементах. Физиологическое разнообразие гидролитического грибного комплекса в следствии пассажа через кишечник диплопод снижается. Максимальная концентрация бактерий увеличивается на выбранных селективных средах после пассажа. Предположительно вызвано увеличением доли  $\gamma$ -стратегов в ряду сообществ корм-кишечник-экскременты. Эко-физиологические параметры экскрементов, корма и кишечника существенно различаются согласно дискриминантному анализу и методу главных компонент. Для дискриминации наиболее значимы жиры (твин 20), белки (казеин), углеводы (целлюлоза и ксилан). Увеличение доли быстрорастущих и доли физиологически активных бактерий для *Orthomorpha* от опада к кишечнику и снижение к экскрементам. В целом при пассаже метаболическая готовность грибов к росту снижается, но при этом скорость подготовки к росту увеличивается. Специфических экофизиологических отличий грибных сообществ из экскрементов и кишечника диплопод разных родов и природных зон не выявлено. Однако в целом сообщества из кишечника, экскрементов и корма различаются по виду кривой роста на средах с целлюлозой, ксиланом, инулином, кератином казеином. Реакция грибного сообщества на пассаж через кишечник диплопод зависит от физиологического состояния грибов в корме, чем более разложившая подстилка, тем эффект меньше. У сапротрофных личинок комаров-толстоножек наблюдается более существенное увеличение доли бактерий  $\gamma$ -стратегов, чем у детритотрофных эндогейных дождевых червей даже при условии питания последних опадом. Что косвенно указывает на более интенсивное разложение органического вещества у комаров-толстоножек.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-50-00029.

# ОТВЕТ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* НА КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕПЛОВОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО ШОКОВ

Е. А. Януцевич<sup>1</sup>, Н. А. Сеницына<sup>2</sup>, В. М. Терёшина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский технологический университет», Москва, Россия

В природе грибы занимают самые разнообразные экологические ниши, где они подвергаются постоянному воздействию изменяющихся условий окружающей среды (температуры, рН, осмолярности и пр.). Как правило, в естественной среде обитания, стрессорные факторы действуют не по отдельности, а совместно, т. е. организм находится в состоянии полистресса, поэтому защитные механизмы являются необходимым условием его существования. Важнейшим звеном адаптации к стрессам является поддержание функционального состояния мембранной системы. В связи с этим представляется интересным исследовать механизмы адаптации мицелиальных грибов к различным комбинациям стрессорных воздействий с точки зрения изменения состава мембранных липидов и состава растворимых углеводов цитозоля, которые могут выполнять протекторную роль в отношении мембран и макромолекул клетки.

Целью данной работы было сравнительное исследование состава мембранных липидов, и растворимых углеводов цитозоля *Aspergillus niger* в условиях действия теплового и осмотического шоков, а также их комбинации.

Эксперимент проводили по следующей схеме. Глубинную культуру гриба, выращенную в оптимальных условиях (29-30°C), в стадии трофофазы переносили на 3 часа в условия действия теплового шока (40-41°C), осмотического шока (0.5 и 1.0 М NaCl), а также их комбинации. Контрольные варианты продолжали культивировать такое же время в оптимальных условиях. Липиды исследовали методом количественной двумерной ТСХ, углеводы – методом ГЖХ.

Растворимые углеводы цитозоля *A. niger* в стадии трофофазы составляли 8-10% от сухой массы и были представлены рядом полиолов - глицерином, эритритом, арабитом, инозитом и маннитом, а также глюкозой и трегалозой. Доминирующим углеводом являлся маннит, составлявший 70-80% от суммы сахаров. Тепловой шок, по сравнению с

контрольным вариантом, стимулировал образование трегалозы до 9% от сухой массы и снижал до следовых количеств уровень глицерина, не влияя при этом на количество маннита. Осмотический шок (0.5 М NaCl) приводил к росту уровня глицерина, не влияя на количество маннита и трегалозы. При комбинированном действии шоков синтезировалось в полтора раза меньше трегалозы, чем при ТШ, и до следовых количеств снижалось количество глицерина, при этом количество маннита не изменялось, что приводило к увеличению соотношения маннит/трегалоза. В более жестких условиях (ТШ+1.0 М NaCl) данная закономерность сохранялась (рис. 1).

К основным мембранным липидам *A. niger*, выращенного в оптимальных условиях, относятся фосфолипиды и стерины (Ст); сфинголипиды (СЛ) являются минорными соединениями. К основным фосфолипидам относятся фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ), кардиолипиды (КЛ), фосфатидные кислоты (ФК), в небольшом количестве присутствуют также фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозиты (ФИ) и лизофосфатидилхолины (ЛФХ). В результате действия теплового шока, осмотического шока, а также их комбинации наблюдалась одинаковая закономерность – увеличение доли фосфатидных кислот на фоне снижения ФЭ, ФХ и КЛ. Сильнее всего данный эффект проявлялся в более жестких условиях (ТШ+1.0 М NaCl) (рис. 2).

Таким образом, комбинированное воздействие теплового и осмотического шока приводило к резкому снижению количества низкомолекулярных полиолов и росту уровня трегалозы, т.е. к реакции, характерной для теплового шока. При этом по сравнению с ТШ, трегалозы синтезировалось меньше, что приводило к росту соотношения маннит/трегалоза. В изменении состава мембранных липидов во всех вариантах опыта обнаружена общая закономерность – повышение доли ФК на фоне снижения доли остальных мембранных фосфолипидов.

Рисунок 1. Состав углеводов цитозоля мицелиального гриба *A. niger* в условиях комбинированного действия теплового и осмотического шоков

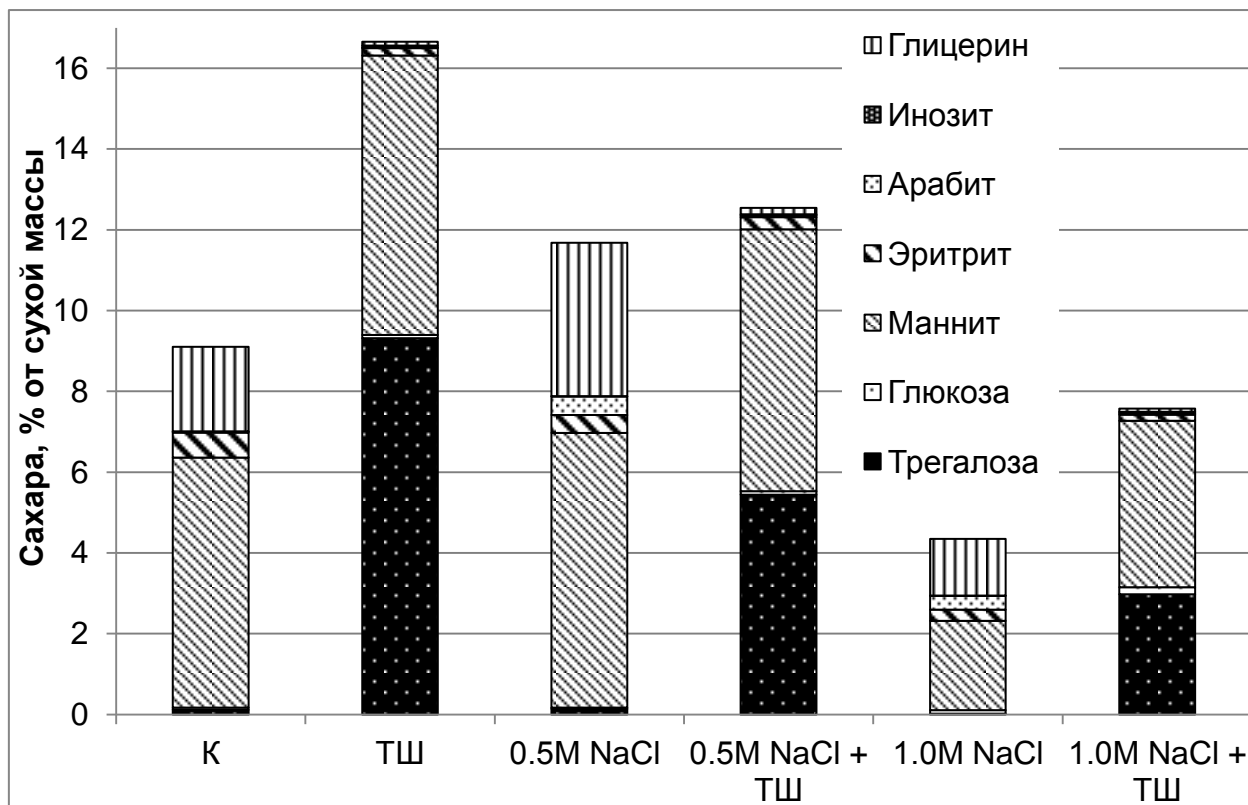


Рисунок 2. Состав мембранных липидов мицелиального гриба *A. niger* в условиях комбинированного действия теплового и осмотического шоков (% от суммы)

