

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Российская академия наук
Сибирское отделение Российской академии наук
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Институт биохимии и генетики РАН
Иркутская государственная медицинская академия
последипломного образования

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Тезисы
Всероссийской научной конференции
с международным участием

Иркутск, 4–7 июня 2019 г.



УДК 579(063)

ББК 28.4д0

М55

*Издание сборника осуществлено
при финансовой поддержке Минобрнауки России*

Ответственный редактор

д-р биол. наук, проф. В. К. Войников

Редакционная коллегия:

д-р биол. наук, Ю. А. Маркова, канд. биол. наук Л. А. Максимова,
канд. биол. наук Л. А. Беловежец, канд. биол. наук Т. В. Копытина,
канд. биол. наук А. Г. Еникеев, канд. биол. наук А. Л. Турская

М55

Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : тез. Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Иркутск, 4–7 июня 2019 г. / [отв. ред. В. К. Войников] ; СИФИБР СО РАН. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2019. – 216 с.

ISBN 978-5-9624-1718-9

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

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

УДК 579(063)

ББК 28.4л0

Mechanisms of microorganisms adaption to different habitat conditions: Proceedings of All-Russian Scientific Conference with International Participation. Irkutsk, June 4–7, 2019. Irkutsk, Irkutsk State University Publ., 2019. 222 p.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Баймиев Ан. Х., Владимирова А. А., Чубукова О. В., Матниязов Р. Т., Вершинина З. Р., Баймиев Ал. Х. Дикорастущие бобовые растения как источник разнообразия клубеньковых бактерий	10
Беловежец Л. А., Третьякова М. С., Маркова Ю. А. Использование биохимического потенциала микроорганизмов для снижения техногенной нагрузки на окружающую среду	12
Горшкова А. С., Дрюккер В. В. Бактериальные биопленки в условиях инфицирования автохтонными бактериофагами в оз. Байкал	14
Граскова И. А. Нанокompозиты как эффективный и безопасный способ борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений	16
Гуревич Ю. Л., Теремова М. И. Адаптация штамма или ассоциации микроорганизмов? Что, когда и где?	19
Журина М. В., Ганнесен А. В., Мартьянов С. А., Борзенков И. А., Плакунов В. К. Управление формированием микробных биопленок: значение для экологии, медицины и биотехнологии	22
Кондратьева Л. М., Шадрина О. С., Литвиненко З. Н., Крутикова В. О. Адаптация микроорганизмов к условиям карстовых пещер	24
Николаев Ю. А., Сузина Н. Е., Соляникова И. П., Лойко Н. Г., Мулюкин А. Л., Эль-Регистан Г. И. Биотехнологический потенциал цистоподобных покоящихся клеток микроорганизмов как формы адаптации к смене ростовых условий	27
Турковская О. В., Муратова А. Ю. Взаимодействия микроорганизмов и растений в условиях загрязнения окружающей среды	29
Цыренов В. Ж. Особенности физиолого-биохимических процессов коринеподобных бактерий-продуцентов нуклеотидов, выделенных из природных источников	32

СЕКЦИЯ 1. МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Арашкова А. А., Гончарова И. А., Тригубович А. М. Адаптивные возможности грибов рода <i>Aspergillus</i> , вызывающих плесневое поражение помещений	35
Безматерных К. В., Смирнова Г. В., Тюленев А. В., Октябрьский О. Н. Роль глутатиона и гуанозинтетрафосфата в поддержании гомеостаза цистеина при ингибировании синтеза белка у бактерии <i>Escherichia coli</i>	38
Бондаренко С. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н. Облигатно алкалофильные грибы в засоленных местообитаниях	41
Букин С. В., Иванов В. Г., Погодаева Т. В., Новикова А. С., Земская Т. И. Изменения состава и структуры анаэробных сообществ донных отложений озера Байкал при культивировании с различными биополимерными и метаногенными субстратами	43
Верхозина Е. В., Верхозина В. А., Верхотуров В. В. Образование эндонуклеаз рестрикции в байкальских штаммах микроорганизмов как их реакция на антропогенное влияние	45
Владимирова А. А., Гуменко Р. С., Акимова Е. С., Баймиев Ан. Х., Баймиев Ал. Х. Функциональная специфичность регуляторного белка NifA внутри группы клубеньковых бактерий	47
Галачьянц А. Д., Подлесная Г. В., Тихонова И. В., Белых О. И. Адаптация микробного сообщества поверхностного микрослоя воды к экстремальному воздействию солнечной радиации	50
Данилова О. А., Януцевич Е. А., Бондаренко С. А., Георгиева М. Л., Викчижанина Д. А., Гроза Н. В., Биланенко Е. Н., Терёшина В. М. Роль осмолитов и липидов в адаптации к внешнему pH и хлориду натрия у галоалкалолотерантного микромицета <i>Emericellopsis alkalina</i>	52
Захаренко А. С., Иванов В. Г., Земская Т. И. Сравнительная характеристика бактериальных сообществ водной толщи в районах разгрузки углеводородов оз. Байкал	53
Зименс Е. А., Суханова Е. В. Ферментативная активность и влияние концентрации органического вещества на скорость роста гетеротрофных бактерий, изолированных из эпиплитических биопленок озера Байкал	55
Каракотов С. Д., Божко К. Н., Масленникова С. Н. Влияние некоторых действующих веществ фунгицидных протравителей на развитие гриба рода <i>Trichoderma</i>	58
Каримов И. Ф., Куликова Н. А., Кондрашова К. С. Окислительный стресс у бактерий	60

Коробов В. П., Лемкина Л. М., Полюдова Т. В. Индукция низкомолекулярным катионным пептидом семейства лантибиотиков варнерином чувствительности бактерий <i>Escherichia coli</i> к полимиксинам (пленарный доклад)	63
Крюкова О. В., Пьянков В. Ф., Рожко Т. В. Отклик люминесцентных бактерий на действие сверхвысокочастотного электромагнитного излучения разного уровня мощности	65
Латышев Н. В., Крюкова О. В., Пьянков В. Ф. Влияние СВЧ-излучения низкой интенсивности на рост колоний <i>Escherichia coli</i>	67
Ломакина А. В., Погодаева Т. В., Иванов В. Г., Хальзов И. А., Петрова Д. П., Черницына С. М., Земская Т. И. Поиск новых филумов микроорганизмов и их способность осуществлять анаэробное окисление метана в осадках озера Байкал	69
Макарова Л. Е., Мориц А. С. Изучение участия протокатахоат оксигеназы в деградации п-фенил-2-нафтиламина и нарингенина у <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> и <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>Sepedonicus</i>	72
Муратова А. Ю., Голубев С. Н., Сунгурцева И. Ю., Турковская О. В. Биоремедиационный потенциал бактерий семейства <i>Rhizobiaceae</i>	75
Неустроев М. П., Тарабукина Н. П. Выживаемость микроорганизмов в условиях вечной мерзлоты	78
Новикова А. С., Ханаева Т. А., Павлова О. Н. Термофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы озера Байкал	80
Ованесян А. П., Столяр С. В., Тирранен Л. С. Антибактериальное действие наночастиц Ag на рост колоний <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
Перфильева А. И., Ножкина О. А., Граскова И. А., Дьякова А. В., Александрова Г. П., Сухов Б. Г., ак. Трофимов Б. А. Влияние нанокompозита селена и каррагинана на возбудитель кольцевой гнили и картофель <i>in vitro</i>	85
Симонова Е. В., Кокорина Л. А., Денисова Т. П., Максимова Е. Н. Приспособительные механизмы выживания <i>S. cerevisiae</i> в присутствии лазерных лучей	88
Суханова Е. В., Зименс Е. А. Чувствительность/устойчивость к антибиотикам гетеротрофных штаммов бактерий, изолированных из различных биотопов озера Байкал	91
Терёшина В. М., Януцевич Е. А., Данилова О. А., Бондаренко С. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н. Механизмы адаптации к внешнему pH у алкалофильных и алкалотолерантных микромицетов	93

Хальзов И. А., Механикова И. В., Ситникова Т. Я., Букин С. В., Земская Т. И. Микроорганизмы, ассоциированные с амфиподами и остракодами в районах разгрузок газосодержащих минерализованных флюидов озера Байкал	96
Черницына С. М., Погодаева Т. В., Дульцева Н. М., Земская Т. И. Микробное сообщество в районе излива горячего сероводородного источника в бухте Змеиная, озеро Байкал	98
Шубенкова О. В., Захаренко А. С., Морозов И. В., Галачянц Ю. П., Калмычков Г. В., Погодаева Т. В., Земская Т. И. Влияние источников связанного азота и углерода на состав Байкальского метанотрофного сообщества	101

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

Бурцева О. И., Кублановская А. А., Баулина О. И., Федоренко Т. А., Лобакова Е. С., Чеканов К. А. Разнообразие симбиотических люминесцентных бактерий Белого моря	103
Глянько А. К. Влияние ауксина и цитокинина на морфогенез корневого клубенька у бобового растения	107
Зайцева Ю. В., Сидоров А. В., Маракаев О. А. Скрининг АГЛ-синтезирующих бактерий в микробном сообществе <i>Dactylorhiza incarnata</i> (L.) Soó (Orchidaceae)	109
Изосимова О. Н., Галачянц А. Д., Подлесная Г. В., Белых О. И. Влияние химического состава воды на численность бактерий нейстона оз. Байкал	111
Ищенко А. А., Филинова Н. В. Влияние клубеньковых и патогенных бактерий на изменение уровня цАМФ и NO в корнях гороха начальных этапах взаимодействия	114
Курамшина З. М., Хайруллин Р. М., Саттарова Л. Р. О возможности конкуренции между эндофитными бактериями <i>Bacillus subtilis</i> и микоризными грибами	117
Лапкина Е. З., Тирранен Л. С. Численность эпифитной микробиоты звездчатки средней (<i>Stellaria media</i> L.)	120
Ляпунова Н. А., Хаснатинов М. А., Данчинова Г. А. Аутэкологические аспекты ко-адаптации вкз и позвоночных хозяев – экспериментальный подход	122
Максимова Л. А., Шафикова Т. Н., Семенов А. А., Еникеев А. Г. Влияние фталатов на колонизационную активность фитопатогена <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	125

Панферова Ю. А., Фрейлихман О. А., Ваганова А. Н., Токаревич Н. К. Полиморфизм некоторых генов факторов вирулентности <i>Coxiella burnetii</i>	128
Шапошников А. И., Вишневская Н. А., Шахназарова В. Ю., О. К. Струнникова Адаптационный потенциал <i>Pseudomonas fluorescens</i> и <i>Fusarium culmorum</i> , колонизирующих ризосферу ячменя	131
Швец К. Ю., Баймиев Ал. Х. Изучение антимикробной активности новых молекул-антибиотиков в отношении возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций	133

СЕКЦИЯ 3. БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КАК ОДНА ИЗ ФОРМ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Белых О. И., Сороковикова Е. Г., Тихонова И. В. Состав и структура цианобактериальных биоплёнок в литоральной зоне оз. Байкал	137
Бынина М. П., Матосова Е. В., Рязанова О. С. Формирование биопленки <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> в пробах воды морей Дальнего Востока	140
Вершинина З. Р., Лавина А. М., Хакимова Л. Р., Баймиев А. Х. Влияние сверхэкспрессии генов <i>pssA</i> , <i>pssB</i> и <i>rosR</i> в трансформированных штаммах ризобий на рост биомассы и образование биопленок <i>in vitro</i>	143
Гончарова А. М., Ломоватская Л. А., Романенко А. С. Влияние нарингенина на формирование биопленок, активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и вирулентность фитопатогенов и мутуалистов растений	145
Живетьев М. А., Кириченко К. А., Быбин В. А., Граскова И. А., Маркова Ю. А. Бактерицидное и противобиопленочное действие иридоидов и фенольных соединений экстрактов манжетки и подбела	146
Кублановская А. А., Чеканов К. А., Баулина О. И., Лобкова Е. С. Микроводоросли <i>Haematococcus lacustris</i> в субполярных условиях	150
Литвиненко З. Н., Кондратьева Л. М. Адаптационный потенциал биопленок железосодержащих подземных вод	152
Матосова Е. В., Ляпун И. Н., Бынина М. П., Рязанова О. С. Влияние гидробионтов тихого океана на формирование биопленки бактериями семейства <i>Enterobacteriaceae</i> в токе жидкости	154
Подлесная Г. В., Галачьянц А. Д., Штыкова Ю. Р., Суслова М. Ю., Белых О. И. Культивируемые азотфиксирующие бактерии в биопленках прибрежной зоны озера Байкал	157

Самойлова З. Ю., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. Действие стрептомицина на планктонные культуры и биопленки <i>Escherichia coli</i> в присутствии экстрактов лекарственных растений	159
Сынгеева А. К., Куликалова Е. С., Мазепа А. В., Корнева А. В., Николаев В. Б., Марков Е. Ю., Козлов С. Н. Структурно-функциональные особенности <i>chi</i> -генов <i>Francisella tularensis</i> и фенотипическая оценка экспрессии хитиназ	162
Федотова И. С., Гладких А. С., Миронова Л. В. Фенотипические и молекулярные аспекты биопленкообразования штаммов <i>Vibrio cholerae</i> , выделенных из объектов окружающей среды	164
Штыкова Ю. Р., Потапов С. А., Краснопеев А. Ю., Тихонова И. В., Суханова, Е. В., Подлесная Г. В., Белых О. И. Характеристика аллохтонных микробных сообществ биопленок и планктона прибрежной зоны озера Байкал	167
Яковлев А. А., Тимченко Н. Ф., Пономарева А. Л., Раков А. В., Еськова А. И., Матосова Е. В. Межвидовые взаимодействия бактерий в поликультуральной биопленке как один из механизмов их саморегуляции в биоценозе (на модели <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> и <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	170

СЕКЦИЯ 4. ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Андреева И. С., Закабунин А. И., Симаков А. В., Рябчикова Е. И., Зайцев Б. Н. Исследование факторов, влияющих на биоконверсию глюкозы в этанол клетками <i>Zymomonas mobilis</i> , иммобилизованных на неорганических носителях	173
Будаева В. В., Миронова Г. Ф., Кашеева Е. И., Гладышева Е. К., Гисматулина Ю. А., Жариков А. Н., Скиба Е. А. Фундаментальные свойства бактериальной наноцеллюлозы	177
Краснова М. Е., Аксёнов-Грибанов Д. В., Переляева Е. В., Васильева У. А., Протасов Е. С., Тимофеев М. А. Оценка воздействия кислорода на синтез вторичных метаболитов у актинобактерий озера Байкал	180
Курамшина З. М., Хайруллин Р. М., Саттарова Л. Р. Использование адаптационного потенциала эндофита <i>Bacillus subtilis</i> для роста растений при переувлажнении почвы	183
Ножкина О. А., Перфильева А. И., Граскова И. А., Сухов Б. Г. Влияние среды на жизнеспособность возбудителя кольцевой гнили	185

Орловская П. И., Мандрик-Литвинкович М. Н., Коломиец Э. И. Создание бактериального консорциума для биоремедиации почвы от остаточных количеств гербицидов и стимуляции роста сельскохозяйственных культур	188
Пухальский Я. В., Кичигина Н. Е., Макарова Н. М., Азарова Т. С., Шапошников А. И., Зиновкина Н. Ю., Wenzel W. W., Сафронова В. И., Белимов А. А. Вариативность клубеньковых бактерий по устойчивости к тяжелым металлам и ионам алюминия	191
Садыкова Л. Р., Благова Д. К., Вершинина З. Р., Хакимова Л. Р., Баймиев А. Х. Модифицированные ризобактерии в фиторемедиации	193
Степаненко Л. А., Джигоев Ю. П., Борисенко А. Ю., Маркова Ю. А., Злобин В. И. Разработка подходов к созданию высокоспецифичной фаготерапии на основании изучения CRISPR / Cas-системы <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	196
Субботин А. М., Петров С. А., Калёнова Л. Ф., Маркевич Т. В., Нарушко М. В., Симонова Е. О., Ренёв Н. О. Перспективы использования биопотенциала микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых пород	199
Третьякова М. С., Беловежец Л. А., Макарова Л. Е., Иванова М. В., Маркова Ю. А. Биодеструкция углеводов нефти с использованием ризосферных микроорганизмов	202
Тригубович А. М., Арашкова А. А., Мямин В. Е., Кантор К. В., Сидоренко А. В. Исследование антимикробной активности антарктических психротолерантных бактерий рода <i>Bacillus</i> по отношению к патогенам растений	204
Тумурова Т. Б., Шалбуев Д. В., Лебедева С. Н., Жамсаранова С. Д. Влияние консорциума микроорганизмов на репаративные свойства коллагенового препарата при технических ожогах	206
Чеканов К. А., Кублановская А. А., Федоренко Т. А., Лобакова Е. С. Разнообразие микроводорослей-продуцентов каротиноидов в прибрежной зоне Кандалакшского залива Белого моря (Россия, Карелия)	209
Шеховцова Н. В., Меркурьев А. Н., Тимрот С. Д. Предварительное исследование биоремедиационного потенциала в местах складирования продуктов нейтрализации кислых гудронов	210
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	213

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ДИКОРАСТУЩИЕ БОБОВЫЕ РАСТЕНИЯ КАК ИСТОЧНИК РАЗНООБРАЗИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Ан. Х. Баймиев, А. А. Владимирова, О. В. Чубукова,
Р. Т. Матниязов, З. Р. Вершинина, Ал. Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа
e-mail: baymiev@anrb.ru

Группу клубеньковых бактерий, или ризобий, составляют микроорганизмы, способные к образованию азотфиксирующего симбиоза с бобовыми растениями с образованием на их корнях клубеньков. Данная группа насчитывает более чем 98 видов бактерий, сгруппированных в 13 родов, принадлежащих к α -протеобактериям (*Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Phylobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinela*), и β -протеобактериям (*Burkholderia*, *Cupriavidus* (*Ralstonia*)) [Berada, 2014]. Ризобии имеют как сапрофитную, так и симбиотическую способы существования. Для симбиотического существования клубеньковые бактерии должны содержать в составе генома симбиотические гены, продукты которых участвуют в различных стадиях взаимоотношения бактерии и растения. Это такие гены, как *nif*-гены, кодирующие синтез и регуляцию фермента нитрогеназы; *nod*-гены, которые кодируют синтез Nod-факторов (НФ), отвечающих за инициацию и специфичность образуемого симбиоза; а также *fix*-гены, которые также необходимы для азотфиксации, часто сцепленные с *nif*-генами [Проворов, 1996; Franche, 2009].

В сапрофитном состоянии бактерий симбиотические гены для нее являются ненужной нагрузкой, потеря которой лишь увеличивает конкурентоспособность бактериальных клеток. А при образовании симбиоза наличие их является необходимым. Поэтому для клубеньковых бактерий характерно постоянное потеря/приобретение симбиотических генов. В данном процессе непосредственное уча-

стие принимает растение-хозяин, который увеличивает в прикорневой зоне пул бактерий, имеющих симбиотические гены за счет их клонального размножения в клубеньках и дальнейшего выхода в почву при отмирании этих структур. В свою очередь, sym^{+} бактерии выступают как в качестве агентов, способных к образованию симбиоза со своим растением хозяином, так и донорами sym -генов для sym^{-} бактерий. А при потере симбиотических генов могут спокойно существовать в виде сапрофитов. Постоянные процессы потери и приобретения sym -генов, сопряженные с «инфекцией и освобождением» (ИО-циклы) [Проворов и Воробьев, 2012], требуют от клубеньковых бактерий высокой активности горизонтального переноса генов, что, в свою очередь, является одной из причин высокого полиморфизма популяций данных микроорганизмов.

Нами в ходе наших исследований по филогении клубеньковых бактерий, их симбиотических генов, а также распределения генотипов бактерий в клубеньках определенных видов растений было обнаружено, что для бобовых растений большее значение имеет состав и генетические варианты симбиотических генов, нежели филогения самих бактерий. Можно сказать, растения не стремятся к обогащению своей ризосферы определенными, может и суперэффективными штаммами, а увеличивают относительную концентрацию наиболее подходящих для них наборов симбиотических генов, носителями которых могут быть и нетипичные клубеньковые бактерии. Известно, что растения способны за счет корневых выделений активировать рекомбинационные процессы ризобий [Ling, 2016]. Таким образом, именно растения «заставляют» бактерии получать симбиотические гены, переводя их из сапрофитов в симбионты. При активации горизонтального переноса генов образуется значительное количество штаммов, которые могут относиться к различным таксономическим группам, из которых растение выбирает наиболее для себя подходящие варианты.

Работа подготовлена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-020201 p_a, № 18-34-00034 мол_a, гранта УМНИК № 12605ГУ/2017.

Литература

Проворов Н. А., Воробьев Н. И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. СПб.: Информ-Навигатор, 2012.

Проворов Н. А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерий // Генетика. 1996. Т. 32, № 8. С. 1029–1040.

Berada H, Fikri-Benbrahim K. Taxonomy of the Rhizobia: current perspectives // British Microbiology Research Journal. 2014. Vol. 4, N 6. P. 616–639. doi: 10.9734/BMRJ/2014/5635

Franché C., Lindström K., Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants // Plant Soil. 2009. Vol. 321. P. 35–59. doi: 10.1007/s11104-008-9833-8

Ling J., Wang H., Wu P. et al. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island // PNAS. 2016. Vol. 113, N 48. P. 13875–13880. doi: 10.1073/pnas.1615121113

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

Л. А. Беловежец¹, М. С. Третьякова², Ю. А. Маркова²

¹ Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: lyu-sya@yandex.ru

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: marina-tretjakova@yandex.ru

Производственная и бытовая деятельность человека сопровождается выбросом в окружающую среду большого количества загрязняющих веществ. К ним можно отнести коммунальные отходы, ТБО, отходы промышленных и сельскохозяйственных предприятий. Аварийные ситуации многократно увеличивают количество отходов. Используемые в настоящее время методы утилизации отходов не всегда эффективны и экологически безопасны, а иногда приводят к вторичному загрязнению. С этой точки зрения, перспективными являются методы, использующие разнообразные микроорганизмы и микробные сообщества. Наиболее характерным примером может быть использование активного ила в очистных сооружениях. Данный метод хорошо отработан, понятны процессы, происходящие при очистке, изучено сообщество микроорганизмов, осуществляющих деструкцию. Однако другие отходы не так легко поддаются микробной деградации, а подбор оптимальных условий требует дополнительных исследований.

В рамках данного исследования были использованы следующие субстраты: гидролизный лигнин, опилки различных пород деревьев, сырая нефть. Ранее нами были подобраны ассоциации микроорганизмов, наиболее эффективно разлагающие эти субстанции. Целью работы была оценка биохимического потенциала исследованных микроорганизмов для максимально полной биотрансформации вышеуказанных субстратов.

Процессы, происходящие при микробном разложении как опилок, так и гидролизного лигнина можно охарактеризовать как оксидоредуктазные, сопровождающиеся окислением концевых молекул лигнина с последующим их отщеплением и раскрытием бензольного кольца. Основными ферментами в данном случае будут полифенолоксидаза, Mn-зависимая пероксидаза, пероксидаза. В случае опилок дополнительно идет разложение волокон целлюлозы с образованием олигосахаридов и, затем, глюкозы (целлюлазы, инвертазы). Нефть с химической точки зрения гораздо более сложная система, требующая для своего разрушения целого спектра разноплановых ферментов. В нашей работе мы исследовали разложение только ароматической компоненты нефти, как наиболее токсичной. Для этих процессов требуется присутствие у микроорганизма оксигеназ и дегидрогеназ. Все эти ферменты субстратспецифичны, поэтому основным способом их детекции служит улавливание продуктов разложения ароматических веществ. Мы исследовали динамику активности ферментов, а также разложение модельных соединений. В качестве контроля биоремедиации использовали фитотоксичность.

Результаты исследования показали, что, независимо от субстрата, микробное воздействие приводит к резкому усилению фитотоксичности, вплоть до полного подавления прорастания семян. Мы связывает это с появлением в процессе микробной модификации субстрата токсичных продуктов его распада (в нашем случае это низкомолекулярные фенольные соединения), что подтверждается повышением уровня полифенолоксидазной и пероксидазной активности. К концу процесса микробной переработки эти показатели снижаются до минимальных значений, а фитотоксичность достигает контрольных значений. Активность основных ферментов сильно зависит от вида микроорганизмов, осуществляющих деструкцию. Так, биотрансформация опилок и гидролизного лигнина грибами приводит к возрастанию активности на начальных стадиях переработки и после перемешивания субстрата, тогда как разложение нефти специфично для каждого микроорганизма и пик активности ферментов может быть как в начале переработки, так и в конце ее. Активность целлюлаз коррелирует с динамикой температуры перерабатываемого субстрата и количеством аэробных целлюлозолитиков в нем. Нами показано, что микробная переработка обязательно приводит к всплеску токсичности перерабатываемого субстрата, однако, за счет эффективной работы ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности

и типу питания, к окончанию переработки токсичность не отличается от контроля, а все показатели биологической активности приходят в норму. Соответственно, процессы, без обработки растягивающиеся на десятилетия, происходят в течение 2–3 месяцев и приводят к полному отсутствию токсичности продукта.

Использование модельных соединений с одной стороны позволяет быстро оценить деградирующий потенциал микроорганизма, а с другой – выявить возможные пути деструкции модели, а, следовательно, и исходных субстратов. В качестве моделей мы использовали пирокатехин, сиреневую кислоту, вератровый спирт, ванилин, ванилиновый спирт гваяцилпропанол-1, нафталин, антрацен, фенантрен. Убыль исследованных веществ оценивалась в динамике, для всех найдены интермедиаты, часть которых была идентифицирована.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что выбранные микроорганизмы обладают потенциалом для переработки соответствующих субстратов, превращая их в безопасные для окружающей среды продукты. Основная роль в переработке принадлежит оксидо-редуктазным ферментам, осуществляющим расщепление сложных ароматических соединений. Использование модельных соединений ускоряет проверку потенциала микроорганизмов, а также дает возможность понять процессы, происходящие при биодegradации или биотрансформации загрязняющего агента.

Исследование поддержано грантом РФФИ и Правительства Иркутской области, проект № 17-45-388078 p_a.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ В УСЛОВИЯХ ИНФИЦИРОВАНИЯ АВТОХТОННЫМИ БАКТЕРИОФАГАМИ В ОЗ. БАЙКАЛ

А. С. Горшкова, В. В. Дрюккер

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: drucker@lin.irk.ru

Биопленки в природной среде и роль вирусов в них пока мало изучены. Нашей целью было изучение вирусного сообщества обростаний с различных бентосных субстратов в литоральной зоне озера Байкал. Были получены данные по таксономическому разнообразию вирусных частиц в толще воды и обрастаниях различных геологических пород, выстилающих литоральную зону оз. Байкал. Оказалось,

что в биопленках, образованных на разных геологических породах, обнаруживаются разные группы вирусных частиц. Кроме того, вирусное сообщество обрастаний и толщи воды в литоральной зоне также отличалось по результатам сравнения морфологии вирусных частиц. В целом можно отметить, что в структуре вирусного сообщества обрастаний доминировали бактериофаги семейства *Podoviridae* (45–50 %) и вирусоподобные частицы без хвостового отростка (35–45 %), в отличие от толщи воды, где традиционно доминируют хвостатые фаги отряда *Caudovirales*. Метагеномный анализ микробного сообщества изученных образцов обрастаний показал, что доминирующими представителями являлись *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* и этот состав существенно отличался от планктонного сообщества [Parfenova et al., 2013]. Кроме цианобактерий при микроскопии также наблюдались другие автотрофы: зеленые и диатомовые водоросли [Sorokovikova et al., 2013]. Очевидно, доминирующие виды микроорганизмов и являются хозяевами для обнаруженных в биопленках вирусных частиц. Согласно современной модели «убить победителя», в популяции доминируют те вирусы, чей хозяин доминирует в популяции.

Нами было изучено формирование биопленки бактерий *Pseudomonas aeruginosa* в условиях вирусной инфекции *in vitro*. Мы наблюдали, что также как и у планктонных клеток, у клеток, иммобилизованных в биопленку на некоторое время (6–24 ч) наблюдается значительная задержка развития по сравнению с контролем, что очевидно связано с размножением вирусов и лизисом клеток. При изучении различных видов бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* мы выявили, что различные вирусы могут оказывать различный эффект на биопленку. Как правило, литические фаги и смесь различных бактериофагов интенсивнее сдерживала рост биопленки как на этапе ее формирования, так и уже сформированную биопленку.

Литература

Parfenova V. V., Gladkikh A. S., Belykh O. I. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal // Microbiology. 2013. Vol. 82, N 1. P. 91–101.

Sorokovikova E. G., Belykh O. I., Gladkikh A. S., Kotsar O. V., Tikhonova I. V., Timoshkin O. A., Parfenova V. V. Diversity of Cyanobacterial Species and Phylotypes in Biofilms from the Littoral Zone of Lake Baikal // Journal of Microbiology. 2013. Vol. 51, N 6. P. 757–765.

НАНОКОМПОЗИТЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ И БЕЗОПАСНЫЙ СПОСОБ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

И. А. Граскова

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

Различные заболевания культурных растений, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями, широко распространены в современном растениеводстве. Бактерии р. *Clavibacter* поражают широкий круг культурных и сорных растений. Одним из представителей этого рода является *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) – возбудитель кольцевой гнили картофеля, и на сегодняшний день не существует эффективных способов борьбы с ним. Более того, в настоящее время отсутствуют химические и биологические агенты, способные ограничивать распространение бактериальных болезней картофеля. Необходимо разработать эффективные против бактерий и безопасные для растений агенты для оздоровления картофеля от фитопатогенной грамположительной бактерии *Cms* с применением препаратов на основе природных соединений.

Развитие нанотехнологий позволяет внедрять во многие сферы человеческой деятельности – медицину, сельское хозяйство и пищевую промышленность инновационные материалы, но в целом в фитопатологии нанокompозитные материалы практически не применяются.

В настоящей работе продемонстрирован экологически безопасный способ оздоровления картофеля от бактериальных патогенов с помощью разработанных нами нанокompозитов и выявлено их влияние на жизнеспособность бактерий *Cms* и биометрические показатели картофеля *in vitro*.

При совместном культивировании бактериального патогена с нанокompозитом селен/арабиногалактан, а также его предшественников – чистый арабиногалактан и диоксид селена, было показано, что арабиногалактан не влияет на жизнеспособность бактерий. Диоксид селена подавлял рост суспензионных клеток патогена, а при добавлении нанокompозита наблюдали наиболее выраженное подавление роста бактерий. Спустя 24 ч инкубации бактериальные клетки изменяли свои размеры (например, длина уменьшалась в 2,5 раза) и слипались. По-видимому, нанокompозит способен изменять мембранную проницаемость клеток бактерий, в результате чего наблюдается изменение размеров микробных клеток.

Наноккомпозит крахмал/селен. Крахмал является самым распространенным углеводом. Структурные элементы этого полимерного соединения – молекулы глюкозы – могут использоваться многими микроорганизмами в пищевой цепочке. В процессе ассимиляции происходит усвоение питательных веществ и использование их для синтеза клеточных структур. В процессе диссимиляции питательные вещества разлагаются и окисляются, при этом выделяется энергия, необходимая для жизни микробной клетки. Поэтому была синтезирована антисептическая наноккомпозитная субстанция, у которой эффективные антимикробные свойства могут задаваться как наночастицами, так и трофическим для бактерий крахмалом, входящим в состав наноккомпозита.

Были получены наноккомпозиты состоящие из наночастиц селена, упакованных в матрицу из крахмала (НК Se/K). С использованием просвечивающего электронного микроскопа было выявлено, что наночастицы селена Se(0) хорошо визуализируются и имеют форму, близкую к сферической. Размер наночастиц НК Se/K составлял 20–90 нм, средний размер 40 нм. О способности наноккомпозита селена подавлять жизнеспособность фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) судили по бактерицидному и бактериостатическому эффектам. Предшественник наноккомпозитов селена – БИС характеризовался бактериостатическим эффектом. Крахмал стимулировал рост бактериальной культуры. Наноккомпозит снижал жизнеспособность клеток примерно в 2 раза.

Наблюдаемый эффект снижения прироста бактерий и изменение их морфологии после инкубации с наноккомпозитами, вероятно, связан с локальными деструктивными изменениями клеточной стенки бактерий. Было показано изменение жирно-кислотного состава бактерий после инкубации с наноккомпозитами селена и арабиногалактана, при этом наблюдалось увеличение количества насыщенных жирных кислот. Такое изменение приводит к нарушению жидкостно-кристаллических свойств клеточных мембран бактерий, что в свою очередь, может менять способность бактериальных клеток к агрегации, изменять их форму и даже приводить к разрушению клеточных мембран и гибели бактерий. Также более подробные исследования с использованием электронной микроскопии позволили нам обнаружить факт прикрепления наночастиц к поверхности бактериальной клетки, что, вероятно, приводит к нарушению ее окислительно-восстановительного потенциала.

В естественных условиях бактерии обычно испытывают недостаток питательных веществ, поэтому возможно применение изу-

ченного нанокompозита как носителя с адресной доставкой частиц селена, при использовании которых бактериями в качестве питательного средства впоследствии происходит нарушение их жизнедеятельности и гибель бактериального патогена. Результаты визуализации взаимодействия микробных клеток и НКSe позволяют предположить, что механизм действия нанокompозита на бактериальные клетки связан с изменением их мембранной проницаемости.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у нанокompозита селена с крахмальной матрицей бактерицидных и бактериостатических свойств в отношении кольцевой гнили картофеля, вызываемой *Cms*. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования нанокompозита с наночастицами селена для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

Гуминовые вещества/серебро. Гуминовые вещества выбраны в качестве матриц для наночастиц серебра, поскольку они представляют собой основной органический почвенный компонент, который также является первичным метаболитом для большинства микробов, находящихся в почве. Гуминовые вещества (ГВ) выделяли щелочной экстракцией из объектов монгольских месторождений: ГВ-гр – из грязей озера Гурван-Нуур, ГВ-уг – из бурых углей Багануур, а также ГВ-уг – из сланцевых месторождений. Серебро и НЧ серебра являются эксклюзивным антимикробным агентом и мы подтвердили, что AgNO_3 значительно подавлял рост бактерий *Cms*, но и негативно влиял на биометрические показатели растений. Для устранения этого негативного влияния использовали НК с НЧ серебра в матрицах различных по происхождению ГВ. Полученные результаты позволили выявить, что ГВ-гр способны стимулировать рост бактерий. Установлены максимально эффективные ингибирующие нанокompозиты, это НК ГВ-гр/Ag и НК ГВ-уг/Ag. Введение НЧ серебра в матрицы ГВ (НК ГВ-гр/Ag и НК ГВ-уг/Ag) усиливало их бактериостатический эффект, но в несколько меньшей степени, чем таковой, оказываемый нитратом серебра. Наблюдаемый бактериостатический эффект может быть связан с разрушением клеточной стенки бактерий, происходящим вследствие взаимодействия наночастиц с клеточной стенкой бактерий, которые изменяют окислительно-восстановительный потенциал клетки бактерии.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов с рядом веществ – как нанокompозитов, так и ГВ, были выявлены агенты, обладающие наибольшей бактериостатической активностью и отсутствием негативного влияния на растения картофеля. Получен-

ные результаты свидетельствуют о наличии у некоторых из исследуемых веществ (НК ГВ-гр/Ag, НК ГВ-уг/Ag) бактериостатических свойств и негативного эффекта при образовании биопленок в отношении кольцевой гнили картофеля, вызываемой *Cms*. При этом положительным влиянием на растения характеризовался ГВ-гр нанокompозит, полученный из них НК ГВ-гр/Ag. Не оказывали выраженного негативного эффекта на картофель другие исследуемые нанокompозиты.

Представленные данные свидетельствуют о возможности использования нанокompозитов с наночастицами серебра для обработки культурных растений против бактериальных заболеваний.

АДАПТАЦИЯ ШТАММА ИЛИ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ? ЧТО, КОГДА И ГДЕ?

Ю. Л. Гуревич, М. И. Теремова

Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН»,
г. Красноярск, e-mail: btchem@mail.ru

При использовании микробиологических процессов в целях синтеза биомассы и биопродуктов, деградации загрязняющих и токсичных соединений при очистке сточных вод или для биоремедиации загрязненных почв и грунтов возникает необходимость адаптации микроорганизмов к высоким нагрузкам. Это может быть экстремальная нагрузка по субстрату, токсичные субстраты, ксенобиотики, ионы тяжелых металлов и другие факторы, снижающие эффективность процесса в целом. Механизмы адаптации микроорганизмов множественны и многообразны. Они происходят на разных уровнях организации – клеточном, популяционном и в многовидовых сообществах. Временные масштабы адаптационных перестроек, как нередко считают, могут занимать от секунд (!?) до нескольких месяцев и лет. В открытой среде микробиологические процессы идут в сообществах, в которых адаптация к изменяющимся условиям среды идет с изменением видовой структуры, на что требуется 10–20 и более генераций популяций. Это медленный процесс.

Быстропротекающие процессы, скорее всего, не требуют геномных перестроек, и задача адаптации микроорганизмов (штаммов) может быть решена путем регуляции функционирования ферментных систем. Рассмотрим для примера рост факультативных анаэро-

бов в непрерывной культуре (хемостате) на среде с глюкозой. Известно, что потребление глюкозы клеткой осуществляется при участии двух ферментных систем: анаэробный этап (гликолиз) и аэробное окисление до CO_2 . При повышении нагрузки по глюкозе активность гликолиза может возрасть в десятки раз в течение секунд. Рост интенсивности дыхательной цепочки определяется временем синтеза ферментов и увеличения их концентрации. Следовательно, интенсивность аэробного метаболизма растет многократно медленнее. Если скорость накопления продуктов гликолиза выше, чем скорость потребления в системе аэробного метаболизма, то даже при наличии кислорода в культуре будут накапливаться продукты неполного окисления глюкозы, которые снижают эффективность ее использования. Разные скорости изменения интенсивностей анаэробного и аэробного метаболизма в ответ на изменение концентрации глюкозы приводят к тому, что в культуре могут реализоваться два режима – низкой либо высокой эффективности использования ее на синтез биомассы. Первый режим стабильный, второй метастабильный, который может быть получен только путем регулирования питанием на стадии пуска процесса. В серии экспериментов в непрерывной культуре *E. coli* (штаммы *B* и *MRE*) при концентрации глюкозы 50 г/л экономический коэффициент составлял 0,6 г/г в метастабильном состоянии и 0,1–0,4 в стабильном.

Эффективность сообщества или смешанной культуры (с относительно малым разнообразием видов или штаммов) зависит от возможностей доминантного микроорганизма (штамма). Можно считать, что адаптация его к новым условиям будет существенной или даже определяющей для эффективности роста всего сообщества. Имея в виду это, предложенная идея вывода культуры штамма микроорганизмов в режим эффективного окисления высоких концентраций субстратов была использована при очистке сточных вод производства синтетических смол. В многомесячном промышленном процессе концентрация общего фенола в прошедшей биообработку фузельной воде снижалась в среднем до 18,6 мг/л и в надсмольной – 22,5 мг/л. На входе установки непрерывного действия концентрация фенолов составляла в среднем 3,2 и 18,6 г/л, соответственно. Пиковая концентрация фенола в надсмольной воде достигала 40 г/л. Одновременно сточная вода содержала метанол (до 60 г/л, остаточная концентрация порядка 100 мг/л) и формальдегид (10 г/л).

Ассоциация микроорганизмов также может быть адаптирована к деградации смешанного и токсичного субстрата без использования

серии пересевов на среды с нарастающей концентрацией его или введения специализированных штаммов. Для примера рассмотрим процесс биоочистки сточных вод коксохимического производства. До проведения мероприятий по коррекции процесса и введения его в режим более эффективного окисления фенолов, нафталина и других полициклических соединений непрерывный промышленный процесс шел в течение 10 лет. Процесс нарушался при концентрации нафталина в стоке около 100 мг/л. Суть корректировки состояла в изменении потоков сточной воды в двухступенчатой схеме очистного сооружения, которое включало 9 аэротенков емкостью 300 м³ каждый. Один аэротенк второй ступени временно был переведен в режим периодического культивирования на сточной воде с увеличенной концентрацией нафталина. После переключения его в непрерывный режим очистки коэффициент вариации уменьшился в 2,8 раза, концентрация общего фенола снизилась до 0,6–0,8 мг/л (Рис.). Устойчивый процесс сохранялся при 5–10-кратной перегрузке по нафталину на протяжении всего периода наблюдений (2 года).

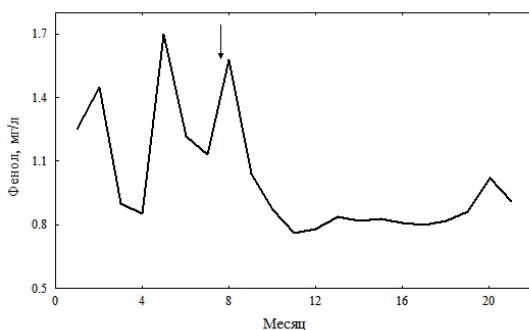


Рис. Биодegradация фенолов в промстоках коксохимического производства (стрелкой показан момент корректировки технологической схемы очистки стоков)

Существование нескольких устойчивых состояний это общее и характерное явление, как для технических, так и живых объектов. Адаптация и приведение микробиологических процессов к наиболее эффективному состоянию, как показывают приведенные примеры, может достигаться при определенных управляющих воздействиях (не биологической природы!) на процесс. Спонтанный выход микробиологических процессов в наилучшее из альтернативных состояний возможен не всегда.

УПРАВЛЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК: ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ЭКОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ

**М. В. Журина, А. В. Ганнесен, С. А. Мартьянов,
И. А. Борзенков, В. К. Плакунов**

Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, г. Москва, e-mail: mzhurik@mail.ru

Биопленки – преимущественная форма существования микроорганизмов в природных экотопах – представляют собой пространственно и метаболически структурированные сообщества, заключенные во внеклеточный полимерный матрикс и расположенные на границе раздела фаз. [Николаев, Плакунов, 2007]. Образование биопленок обеспечивает защиту сообщества микроорганизмов от неблагоприятных условий внешней среды – поэтому они особенно характерны для экстремальных экотопов: горячих источников, глубоководных вулканов, а также экотопов техногенных загрязнений. Исследования показывают, что защитный эффект биопленок для входящих в них микроорганизмов резко возрастает в мультивидовых вариантах, которые являются основными в природных условиях. Примеры природных мультивидовых сообществ микроорганизмов со сложным взаимодействием между компонентами – микробные маты и многие другие природные ассоциации [Ножевникова и соавт., 2015; Saxena et al., 2019]. Особенно велико значение биопленок для медицины, поскольку они обеспечивают защиту патогенных микроорганизмов от воздействия дезинфицирующих средств и антибиотиков. Одна из острейших проблем – обрастание патогенными микроорганизмами медицинских имплантатов.

Еще одна глобальная проблема состоит в том, что как в природных, так и в антропогенных системах биопленки являются резервуаром патогенных микроорганизмов, многие из которых устойчивы к большинству применяемых в химиотерапии антибиотиков.

В организме человека и животных мультивидовые биопленки могут формироваться как в ротовой полости, так и в кишечнике, на коже, на слизистой оболочке влагалища, в дыхательных путях. Основными компонентами микробиоты человека являются бактерии и дрожжи, однако встречаются и другие микроорганизмы, в том числе археи [Horz, 2015]. Множество работ посвящено взаимодействию

между компонентами микробиоты человека, а также попыткам управлять формированием этих биопленок или же модулировать их состав.

В рамках биотехнологических процессов микробные биопленки находят широкое применение в связи с устойчивостью к внешним воздействиям, а также стабильностью в условиях проточного культивирования (особенно важной для медленно растущих микроорганизмов). После формирования биопленок их можно использовать без поддержания стерильных условий, не опасаясь контаминации посторонней микрофлорой. Самые распространенные области практического применения биопленок в биотехнологических целях – очистка сточных и грунтовых вод от загрязняющих веществ, биоремедиация почв, биосинтез биологически активных веществ. Разнообразие метаболических процессов и способность к утилизации ксенобиотиков как пищевых веществ (без внесения дополнительных субстратов) сделало их перспективными объектами для использования в биоремедиации и биологической очистке природных сред.

Для управления процессом формирования биопленок необходимо понимание стадий их формирования. Важнейшими из них являются первичная адсорбция микробных клеток на поверхности раздела фаз, обратимая адгезия микробных клеток на биотических или абиотических поверхностях, необратимая адгезия микробных клеток (или проникновение их внутрь тканей многоклеточного организма), созревание биопленок и стадия дисперсии с освобождением микробных клеток в окружающую среду [Плакунов и соавт., 2017]. На сегодняшний день максимально эффективны методы воздействия на начальные этапы формирования биопленки, прежде всего – предотвращение адгезии клеток на поверхности раздела фаз. Используются особые покрытия (обычно с биоцидными добавками) – как для подавления неспецифичной адгезии, так и для предотвращения специфичной. Эти покрытия препятствуют формированию адгезированных структур микроорганизмов – первичных колонизаторов. Кроме того, существуют пути ингибирования формирования биопленок на этапе их созревания (например, использование ингибиторов системы QS) и подавление уже зрелых биопленок (например, воздействие ферментами, разрушающими компоненты матрикса биопленок и/или бактериофагами и их ферментами) [Плакунов и соавт., 2017]. Параллельно развивается стратегия стимулирования сообществ, полезных для биотехнологических и медицинских целей, хотя количество работ, посвященных этой проблеме пока невелико.

Несомненно, управление процессами реконструкции и формирования микробных биопленок приобретает все большее значение в экологических, медицинских и биотехнологических аспектах их использования, что требует повышенного внимания к глубокому изучению этой глобальной проблемы. *Грант РФФИ №18-29-05048.*

Литература

Николаев Ю. А., Плакунов В. К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.

Ножевникова А. Н., Бочкова Е. А., Плакунов В. К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии // Микробиология. 2015. Т. 84, № 6. С. 623.

Плакунов В. К., Мартыанов С. В., Тетенева Н. А., Журина М. В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 402–420.

Horz H. -P. Archaeal lineages within the human microbiome: absent, rare or elusive? // Life. 2015. Vol. 5. P. 1333–1345.

Saxena P., Joshi Y., Rawat K., Bisht R. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms // Indian J. Microbiol. 2019. Vol. 59. P. 3–12.

АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ К УСЛОВИЯМ КАРСТОВЫХ ПЕЩЕР

Л. М. Кондратьева¹, О. С. Шадрина¹,
З. Н. Литвиненко¹, В. О. Крутикова²

¹Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,
г. Хабаровск, e-mail: kondratevalm@gmail.com

²Институт тектоники и геофизики им. Ю. А. Косыгина ДВО РАН,
г. Хабаровск

Карстовые пещеры являются уникальным местообитанием для развития микроорганизмов. Специфика их функционирования в этих условиях связана с периодичностью поступления трещинной и грунтовой воды, содержащей различные по своему строению растворимые органические вещества, продукты выветривания горных пород, включая такие элементы как кальций, магний, железо и другие микропримеси. Способность формировать биопленки отмечена у микробных комплексов, образующих на поверхности стен и потолка пещер слизистые или творожистые, бело-палевые натечные образования (спелеотемы) под названием «лунное молоко» [Sanchez-Moral et al., 2012].

Адаптация микроорганизмов, входящих в состав «лунного молока» к условиям карстовых пещер осуществляется благодаря способности микроорганизмов синтезировать экстрацеллюлярные полимерными субстанциями – EPS и формировать высокоструктури-

рованные биопленки – сложные микробные консорциумы. EPS представлены в основном полисахаридами и протеинами (реже липидами) и содержат комплекс различных функциональных групп таких как карбоксил-, гидроксил-, фосфат- и аминок- группы. Внеклеточные полимерные слизи (полимерный матрикс) позволяют бактериальным клеткам осуществлять адгезию к разным поверхностям, способствуют образованию агрегатов и биопленок [Yin et al., 2015].

Проведенные нами исследования в пещере Прощальная (Хабаровский край) показали, что ведущими факторами, обеспечивающими адаптацию микробных комплексов «лунного молока» к экстремальным условиям, являются их физиологическая гетерогенность и способность синтезировать EPS. Полимерный матрикс выступает мощным биогеохимическим фактором в функционировании биопленок и сорбции различных элементов в массе «лунного молока».

В результате ПЦР анализа в исходных пробах «лунного молока» из пещеры Прощальная были идентифицированы хемолитотрофные железобактерии родов *Rhodospirillum* и *Geothrix*, которые встречаются в железосодержащих подземных водах. Железобактерии способны продуцировать слизистые полимеры, обладают высокой адгезивной активностью и могут исполнять роль первичных колонизаторов поверхности горных пород, инициируя первую стадию образования «лунного молока» и создавая условия для развития гетеротрофных бактерий. На основании культурально-морфологических характеристик и окраски по Граму среди выделенных штаммов были отобраны изоляты, относящиеся к роду *Bacillus*. Было показано, что эти бактерии способны выветривать горные породы за счет продуцирования EPS и выщелачивания элементов из кристаллической решетки [Yuan et al., 2011].

Ранее проведенные исследования «лунного молока» из пещеры Снежная (Абхазия) показали, что *in vitro* обильное слизеобразование сопровождалось растворением кристаллов кальцита [Кондратьева и др., 2016]. В результате экспериментальных исследований активности консорциума «лунного молока» из пещеры Прощальная было установлено, что микроструктура биопленок, формирующихся при разных температурных условиях (4°C и 23°C) существенно изменялась в зависимости от концентрации CaCO_3 (1, 5, 10, 50 г/л) и степени доступности органических веществ (лактат, гумат). Впервые *in vitro* на лактате в течение 60 сут. членами консорциума были сформированы крупные яйцевидные глобулы (4×5 см) со сложной внутренней микроструктурой (рис.). Высокие концентрации кальцита ингибировали слизеобразование и формирование биопленок.

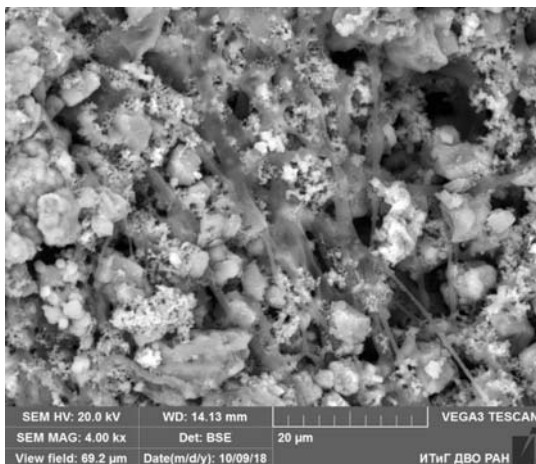


Рис. Электронное изображение внутренней микроструктуры глобулы

Таким образом, при неблагоприятных условиях микробный консорциум, формирующий биомассу «лунного молока» может длительное время существовать в автономном режиме без дополнительного поступления источников углерода. Формирование высоко структурированных биопленок позволяет в условиях синтрофии использовать различные источники углерода, включая продуцируемые метаболиты.

Литература

- Кондратьева Л. М., Полевская О. С., Литвиненко З. Н., Голубева Е. М., Коновалова Н. С. Роль микробного сообщества в формировании натечного образования «лунное молоко» в карстовой пещере Снежная (Абхазия) // Микробиология. 2016. Т. 85, № 5. С. 598–608.
- Sanchez-Moral S., Portillo M. C., Janices I., Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Cañaveras J. C., Gonzalez J. M. The role of microorganisms in the formation of calcitic moonmilk deposits and speleothems in Altamira Cave // Geomorphology. 2012. Vol. 139. P. 285–292.
- Yin C., Meng F., Chen G. -H. Spectroscopic characterization of extracellular polymeric substances from a mixed culture dominated by ammonia-oxidizing bacteria // Water Res. 2015. Vol. 68. P. 4740–4749.
- Yuan S. J., Sun M., Sheng G. P., Li Y., Li W. W., Yao R. S., Yu H. Q. Identification of key constituents and structure of extracellular polymeric substances excreted by *Bacillus megaterium* TF10 for their flocculation capacity // Environ. Sci. Technol. 2011. Vol. 45 (3). P. 1152–1157.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИСТОПОДОБНЫХ ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ФОРМЫ АДАПТАЦИИ К СМЕНЕ РОСТОВЫХ УСЛОВИЙ

Ю. А. Николаев¹, Н. Е. Сузина², И. П. Соляникова²,
Н. Г. Лойко¹, А. Л. Мулюкин¹, Г. И. Эль-Регистан¹

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальных основ
биотехнологии РАН, г. Москва; e-mail: NikolaevYA@mail.ru

²Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований РАН», г. Пушкино

Микроорганизмы составляют основу большинства биотехнологий, базирующихся на использовании микробной биомассы как таковой и её применении как биокатализаторов таких процессов, как биodeградация ксенобиотиков, очистка почв и стоков, синтез целевых продуктов (антибиотиков, ферментов и др.). Микроорганизмам как биокатализаторам присущи свойства, отрицательно сказывающиеся на эффективности и стабильности биотехнологических процессов: (1) чувствительность к действию стрессоров в процессе хранения; (2) высокие скорость и доля отмирающих при получении бакпрепаратов клеток; (3) высокая внутримультипопуляционная (диссоциативная) изменчивость и замещение продуктивных вариантов непродуктивными. Одним из подходов к минимизации этих негативных качеств является использование адаптивного потенциала популяций, который реализуется через образование и прорастание цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК).

ЦПК – это специализированные клетки микроорганизмов, предназначенные для выживания и сохранения вида в неростовых условиях, характеризующиеся особенностями ультраструктурной организации, анабиотическим уровнем метаболизма, высокой устойчивостью к повреждающим воздействиям, и способностью прорасти спектром диссоциантов, из которых доминантным станет наиболее приспособленный к новой среде, что позволяет популяции (виду) приспособиться к новым условиям [Эль-Регистан и др., 2006; Николаев и др., 2006].

Обычно количество ЦПК в популяции составляет доли процента. Поэтому важной фундаментальной и практической задачей является разработка бакпрепаратов на основе популяций с высокой долей ЦПК. В наших исследованиях была сформулирована и в настоящее время последовательно подтверждается гипотеза, согласно которой предшественниками ЦПК являются клетки-персистеры [Му-

люкин и др., 2015]. Персистеры (П) – клетки, вышедшие из цикла деления и устойчивые к летальным дозам антибиотиков, интенсивно изучаются медицинскими микробиологами как базовая причина развития и распространения антибиотикорезистентности [Cabral et al., 2018]. Их образование регулируется как генетически, т. е. связано с активностью определенных регулонов, так и факторами межклеточной коммуникации, аутоиндукторами системы QS, а также индолом и фенольными липидами. После завершения молекулярно-генетических процессов образования П они «созревают» в ЦПК в результате физико-химических процессов биокристаллизации нуклеоида, обезвоживания клетки и витрификации цитоплазмы.

В направлении разработки бакпрепаратов нами предложены следующие подходы к повышению численности ЦПК: (1) получение высокоперсистерных клонов биотехнологически важных микроорганизмов; (2) использование внеклеточных регуляторов образования П и ЦПК, в частности, фенольного липида 4-гексилрезорцина, а также гуминовых веществ, являющихся финальной стадией окислительных превращений алкилрезорцинов. Так, применение последнего подхода повысило количество длительно выживающих клеток углеводородоокисляющих бактерий *Acinetobacter junii* в 10 раз.

Второе направление исследований связано со свойством ЦПК прорасти в виде популяции, отличающейся от исходной расширенным спектром диссоциантов [Эль-Регистан и др., 2006]. На примере *Bacillus licheniformis* (промышленного продуцента протеаз) показано, что при расसेве ЦПК этих бактерий, полученных в культуре доминантного R-варианта под действием гексилрезорцина, в первом пассаже на плотной среде были выделены RM (69,2 %), RS (12,8 %), M (1,4 %), и S (16,6 %) диссоцианты, различающиеся ферментативной активностью, что может быть использовано для селекции продуктивных вариантов. Перспективность использования ЦПК для селекции целевых физиолого-биохимических диссоциантов была продемонстрирована для бактерий-деструкторов ксенобиотиков. Популяция бактерий – деструкторов хлорированных фенолов, вырастающая из ЦПК, была представлена диссоциантами, различающимися биodeградационным ферментативным пулом (оксидаз), в отличие от материнской популяции [Solyanikova et al., 2011]. Этот же прием реализации популяционной вариабельности был применен для других биотехнологически важных микроорганизмов, молочнокислых бактерий, для которых были получены ЦПК, и из вырастающей из них популяции были выделены диссоцианты, различающиеся биотехнологическими свойствами [Лойко и др., 2014].

Таким образом, использование физиологического и адаптационного потенциала покоящихся клеток микроорганизмов можно рассматривать как новое направление в повышении эффективности производств бакпрепаратов и технологий, основанных на ферментативном катализе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-05009 и частичном финансировании Министерством науки и высшего образования РФ.

Литература

Cabral D. J., Wurster J. I., Belenky P. Antibiotic persistence as a metabolic adaptation stress, metabolism, the host and new directions // Pharmaceuticals. 2018. P. 11–14.

Solyanikova I. P., Suzina N. E., Golovleva L. A., Mulyukin A. L., El-Registan G. I. Improved xenobiotic-degrading activity of *Rhodococcus opacus* str Icafter dormancy. // Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 2011. Vol. 46, N 7. P. 638–647.

Лойко Н. Г., Краснова М. А., Пичугина Т. В., Гриневич А. И., Ганина В. И., Козлова А. Н., Николаев Ю. А., Гальченко В. Ф., Эль-Регистан Г. И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков. // Микробиология. 2014. Т. 83, № 3. С. 284–294.

Мулюкин А. Л., Козлова А. Н., Сорокин В. В., Сузина Н. Е., Чердынцева Т. А., Котова И. Б., Гапонов А. М., Тутельян А. В., Эль-Регистан Г. И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84, № 6. С. 645–659.

Николаев Ю. А., Мулюкин А. Л., Степаненко И. Ю., Эль-Регистан Г. И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 489–496.

Эль-Регистан Г. И., Мулюкин А. Л., Николаев Ю. А., Сузина Н. Е., Гальченко В. Ф., Дуда В. И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 446–456.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

О. В. Турковская, А. Ю. Муратова

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
г. Саратов, e-mail: turkovskaya_o@ibppm.ru

В естественных фитоценозах растения и микроорганизмы находятся в сбалансированном состоянии, формируя ту или иную стратегию взаимодействия, позволяющую им существовать в конкретных условиях окружающей среды. Крайними точками многообразных межорганизменных отношений являются мутуализм и антагонизм.

Растительно-микробные взаимодействия осуществляются посредством определенных механизмов: узнавания, таксиса, непосредственного контакта и последующего сосуществования. Эти механизмы сложились в ходе эволюции и на сегодняшний день для отдельных типов коммуникаций достаточно хорошо изучены. Таковыми являются два типа симбиозов: мутуалистический и паразитический. В меньшей степени ясности обстоят дела с так называемым ассоциативным симбиозом, который в настоящее время является «горячей точкой» в исследованиях механизмов растительно-микробных взаимоотношений.

В отличие от млекопитающих, растения не способны передвигаться, в связи с чем их взаимодействия с микропартнерами связаны с множеством химических сигналов. Посредством корневых экссудатов растения секретируют огромное количество химических веществ, которые являются сигнальными агентами и играют ключевую роль в формировании растительно-микробных систем [Bardi et al., 2009]. Однако и микропартнеры принимают активное участие в сигналинге, находясь в постоянной зависимости от растения и множества стрессовых факторов окружающей среды, подвергаясь постоянным изменениям. Показано, что в растительно-микробных системах возможны и такие существенные перестройки, как изменение мутуализма или нейтрализма на паразитизм (патогенез) и др. [Горшков, 2017].

Известно, что взаимодействие между растениями и микроорганизмами корневой зоны имеет решающее значение для биотрансформации органических химических веществ [Fester et al., 2014], поскольку именно ризосфера является зоной повышенной биохимической активности. Вместе с тем, попадание загрязнителя в экосистему привносит дополнительный стрессовый фактор, который может способствовать изменению или нарушению механизмов межорганизменных/межклеточных коммуникаций и различаться в зависимости от вида и концентрации поллютанта.

Некоторые органические поллютанты, обладая химической структурой, подобной отдельным сигнальным молекулам, могут вмешиваться в естественный процесс межорганизменных взаимодействий. Так, образование бобово-ризобийного симбиоза начинается с реакции ризобий на растительные флавоноиды, которые активируют бактериальные гены вирулентности. Среди полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) – одной из групп распространенных и опасных поллютантов, есть вещества, например фенантрен, имеющие структуру, схожую с флавоноидами. Можно

предположить, что его присутствие будет влиять на ход событий при формировании названного симбиоза. Более того, продуктом микробной деградации некоторых ПАУ может быть салициловая кислота, которая, как известно, является фитогормоном биотического стресса, запускающим механизм системной приобретенной устойчивости [Максимов и др., 2015].

Анализ литературных данных показывает, что соединения, модулирующие ассоциативные взаимодействия между растениями и так называемыми PGPR, изучены недостаточно. В основном, они представлены работами по выявлению реакций растений и микроорганизмов на воздействия отдельных поллютантов.

Проведенные нами исследования выявили ряд эффектов воздействия ПАУ на штаммы PGPR и их взаимодействия с растением. Так, *Ensifer meliloti* P221, деструктор ПАУ, выделенный из-под тростника южного, в условиях загрязнения не снижал продукцию ИУК, сохранял положительный таксис к компонентам корневых выделений, стимулировал рост растений (сорго веничное), фиксировал атмосферный азот и растворял фосфаты. Важно отметить, что стимулирующее действие на растение штамм оказывал только в условиях загрязнения. Влияние ПАУ на макропартнера этой ассоциации – сорго веничное было более выраженным: снижались все ростовые показатели сорго, уменьшалось выделение основных компонентов корневых экссудатов, повышалась активность экстраклеточных ферментов, в первую очередь пероксидаз. Инокуляция растения штаммом P221 частично компенсировала негативный эффект загрязнителя. При этом активность растительных ферментов еще более повышалась [Muratova et al., 2015]. Полученные экспериментальные данные являются важным свидетельством существенного воздействия загрязняющих веществ на межорганизменные взаимодействия, которые могут происходить и в природных условиях. Это требует более глубоких исследований с привлечением современных молекулярно-генетических методов.

Еще более важным является изучение влияния поллютантов на сосуществование растений и фитопатогенных микроорганизмов, поскольку может служить подходом к решению одной из основных задач современной фитопатологии – выяснению причин перехода мутуалистической формы взаимодействия микроорганизма с растением к антагонистической [Горшков, 2017], что является крайне важным аспектом успешного растениеводства.

Таким образом, в условиях массированного загрязнения окружающей среды, выводящего огромные площади сельскохозяйственных угодий из оборота, все более остро высвечивается проблема разработки и применения эффективных и предсказуемых технологий фиторемедиации. Это требует глубоких знаний и понимания биохимических и генетических механизмов формирования и функционирования растительно-микробных систем и их взаимодействия с поллютантами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-29-05062).

Литература

- Badri D. V., Weir T. L., van der Lelie D., Vivanco J. M. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions // *Current Opinion in Biotechnology*. 2009. Vol. 20. P. 642–650.
- Горшков В. Ю. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем. Казань: Изд-во Сергея Бузукина, 2017. 304 с.
- Fester T., Giebler J., Wick L. Y., Schlosser D., Kästner M. Plant–microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 27. P. 168–175.
- Максимов И. В., Веселова С. В., Нужная Т. В., Сарварова Е. Р., Хайруллин Р. М. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // *Физиология растений*. 2015. Т. 62, № 6. С. 763–775.
- Muratova A., Dubrovskaya E., Golubev S., Grinev V., Chernyshova M., Turkovskaya O. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa* // *Journal of Plant Physiology*. 2015. Vol. 188. P. 1–8.

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КОРИНЕПОДОБНЫХ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ НУКЛЕОТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

В. Ж. Цыренов

Восточно-Сибирский государственный университет
технологий и управления, г. Улан-Удэ, e-mail: vtsyrenov@gmail.com

Нуклеотиды, нуклеотидные коферменты и аналоги нуклеотидов имеют большие перспективы применения в медицине, пищевой, парфюмерной и других областях промышленности. Разработка теоретических основ методов и технологий их получения представляет собою актуальную научно – техническую проблему. Совершенствование процессов биосинтеза и трансформации и успешное их применение определяются рядом условий, в том числе: наличие активных штаммов – продуцентов; знание биохимических механизмов синтеза, трансформации и систем регуляции у штаммов – продуцен-

тов, которые определяют накопление целевых продуктов. Эти вопросы имеют теоретическую значимость, они затрагивают ряд важных аспектов биохимии и физиологии микроорганизмов.

Основными методами биотехнологии нуклеотидов являются прямой биосинтез (*de novo* синтез), ферментативный гидролиз РНК и синтез из предшественников (*salvage* синтез). Метод *de novo* синтеза основан на применении мутантных микроорганизмов и широко применяется для получения, например, инозина (рибоксина), 5'-инозиновой кислоты, используемых в качестве лекарств и вкусовых добавок. В случае *salvage* синтеза в качестве предшественников используются пуриновые, пиримидиновые основания, нуклеозиды или их синтетические аналоги (8 – азааденин, 6 – азауридин, 5 – бром урацил и другие, обладающие карциностатической и бактериостатической активностью). Данный метод обеспечивает получение очень широкого спектра нуклеиновых производных, в том числе АТФ, НАД, аналоговые нуклеозидфосфаты.

В нашей лаборатории осуществлен поиск штаммов продуцентов из природных источников. Были отобраны 4 микроорганизма, относящиеся к группе коринеподобных бактерий и осуществляющие по *salvage* пути метаболизма активный синтез нуклеотидов, включая аналоговые. Основное внимание нами обращено на недостаточно изученные механизмы *salvage* синтеза нуклеотидов – роль в данном биосинтезе основных энергодающих процессов, таких как окислительное фосфорилирование, гликолиз, а также доноров фосфатов (пентозофосфаты, полифосфаты, нуклеотидный пул). Исследование проводили с использованием выделенного нами продуцента *Corynebacterium flavum* ВСТИ 301 [Бутуханов и др., 1989]

При исследовании реакций биосинтеза нуклеозидмонофосфатов (НМФ) из предшественников с помощью изотопного метода установлено, что активно функционирует ФРПФ (5-фосфо-D-рибозил-1-пирофосфат) – путь по схеме реакций: пуриновое или пиримидиновое основание + ФРПФ $\rightarrow$ НМФ + ФФ. Одновременно происходит сверхсинтез рибозо 5 – фосфата (Р5Ф) и его накопление. Исследование особенностей метаболизма глюкозы у продуцента показало отсутствие у него транскетолазы (КФ 2.2.1.1) Этот и другие результаты исследования позволили сформулировать вывод о том, что блок на уровне этого фермента является причиной, приводящей к сверхсинтезу и накоплению Р5Ф – предшественника ФРПФ [Санданов и др., 1991]. Из НМФ образуется нуклеозидтрифосфаты, НАД и другие продукты, в зависимости от цели ферментации. Биосинтез целе-

вых продуктов требует значительных энергетических затрат и больших количеств доноров фосфатов. Доказана роль гликолиза как генератора энергии в процессах salvage синтеза [Tsytrenov et al., 2010]. Изучены участие доноров фосфатов – полифосфатов, пирофосфата и динамика активностей соответствующих ферментов. Установлена коррелятивная зависимость между изменениями фракций полифосфатов с синтезом нуклеотидов. Показано, что бесклеточный экстракт *S. flavum* катализирует образование нуклеотидов за счет пирофосфата. Описан новый фермент – пирофосфат – АДФ – фосфотрансфераза. Фермент выделен из клеток штамма – продуцента, очищен в 78 раз [Бутуханов и др., 1989]

Предложена гипотетическая схема salvage синтеза пуриновых нуклеозидфосфатов [Цыренов, 2014]. Схема демонстрирует участие полифосфатов, пирофосфата и гликолиза в процессах фосфорилирования нуклеозидфосфатов. Основным источником энергии для salvage синтеза является гликолиз, энергетический эффект которого аккумулируется в полифосфатах. Опосредованно образовавшееся за счет полифосфатов АТФ, может участвовать в salvage синтезе НАД.

Литература

Бутуханов В. Д., Бобык М. А., Цыренов В. Ж., Кулаев И. С. Изучение возможной роли высокомолекулярных полифосфатов в биосинтезе АТФ из экзогенного аденина культурой *Corynebacterium* sp. ВСТИ 301 // Биохимия. 1989. Т. 44. С. 1321 – 1327.

Санданов Ч. М., Ерошина М. В., Цыренов В. Ж., Головлев Е. Л. Изучение метаболического механизма синтеза адениловых нуклеотидов из аденина у коринебактерий // Микробиология. 1991. Т. 50, Вып. 6. С. 1053–1055.

Цыренов В. Ж. Биотехнология нуклеотидов: микробиологический синтез / отв. ред. А. М. Безбородов. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2014. 355 с.

Tsyrenov V. Z., Pinuev I. O., Sandanov A. A. The Role of glycolysis in nucleosidemono-phosphates phosphorylation // Foodstuffs, biocatalysis, environment and biotechnology. New York, Nova Science Publishers. Inc. (USA), 2010, P. 57–63.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

АДАПТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПЛЕСНЕВОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПОМЕЩЕНИЙ

А. А. Арашкова¹, Гончарова И. А.², А. М. Тригубович¹

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск,
e-mail: arashkova.mycology.by@gmail.com

² БелНИИДАД, г. Минск, e-mail: gontcharova.mould@gmail.com

Среди агентов плесневого поражения жилых и общественных помещений грибы рода *Aspergillus* являются наиболее распространенными возбудителями микотически обусловленных заболеваний [Gugnani, 2003]. В музеях, библиотеках, архивах концентрация спор аспергиллов нередко во много раз превышает допустимые значения. Аспергиллы характеризуются высокой устойчивостью к действию биоцидных препаратов и других негативных факторов внешней среды [Арашкова, 2015; Головина, 2015]. Целью данных исследований было изучение адаптивных возможностей грибов рода *Aspergillus*, выделенных из очагов плесневого поражения помещений различного назначения. Установлено, что из видов рода *Aspergillus*, представляющих наибольшую опасность для здоровья людей (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* и *A. versicolor*), наиболее устойчивым к широкому диапазону температур (5–35°C) и влажности материалов (20–80 %) является *A. niger*. По скорости колонизации субстратов с различной влажностью наиболее близким к *A. niger* является *A. flavus*. Наиболее требовательным к насыщению влагой субстрата является *A. fumigatus*, рост которого лимитирует 30 % влажность. Наиболее выраженными ксеротолерантными свойствами обладает *A. versicolor*, развиваясь до стадии спороношения на субстрате с

20 % влажностью. В ходе микроскопического анализа ксеротолерантных штаммов-агентов плесневого поражения выявлено, что при росте на субстрате с пониженной активностью воды ($a_w = 0,85$) аспергиллы обладают рядом морфологических особенностей: набухание и бифуркация конидиогенных головок, деформация фиалид, кустистость конидиеносцев, извилистость и крючковатость мицелия (рис. 1).



Рис. 1. Микроскопический анализ ксеротолерантных штаммов аспергиллов

Признаки нетипичной микроморфологии обычно свойственны клиническим изолятам грибов рода *Aspergillus* [Кулько, 2012]. Важным фактором внешней среды, оказывающим влияние на рост микроскопических грибов, является кислотность среды. От уровня pH зависит активность ферментов, образование пигментов, токсинов. Для большинства микромицетов оптимум pH среды лежит в слабокислой области, в то время как большинство используемых в строительной отрасли материалов – бетон, шпатлевки, штукатурки, кирпич и др. проявляют щелочную реакцию среды. Тем не менее, такие материалы также подвержены плесневому поражению. Исследование свойств штаммов *A. niger*, выделенных из минеральных строительных материалов показало, что способность микромицетов колонизировать субстраты со щелочной pH обусловлена ацидофицирующей активностью грибов. На 7-е сут. культивирования ширина зоны просветления мелового агара достигала 80 % от радиуса колоний за счет выделения во внешнюю среду органических кислот и растворения карбоната кальция. Изучение динамики процесса кислотообразования *A. niger* выявило, что на начальных этапах роста происходит преимущественное накопление в культуральной жидкости молочной, лимонной и янтарной кислот. Максимальное содержание молочной кислоты (1,8 мг/мл) отмечено на 10-е сут., лимонной и янтарной кислот (3,5 и 5,4 мг/мл, соответственно) – на 15-е сут. Содержание щавелевой кислоты постепенно повышалось и к 30-м сут.

культивирования составляло 1,3 мг/мл. Щавелевая кислота играет определяющую роль при взаимодействии аспергиллов с минеральными строительными материалами, при росте на известковом (CaCO_3) или гипсовом (CaSO_4) субстрате детектируется образование кристаллов оксалата кальция, имеющих характерную бипирамидальную форму (рис. 2).



Рис. 2. Кристаллы оксалата кальция вокруг колоний *A. niger* на меловом агаре

Проведенные исследования показали, что грибы рода *Aspergillus* характеризуются широкими адаптационными возможностями по отношению к температуре, влажности и pH колонизируемого субстрата. Благодаря наличию ксеротолерантных свойств, грибы рода *Aspergillus* могут развиваться на материалах с низкой влажностью, включая архивные документы, книги, музейные экспонаты. Штаммы с высокой ацидофицирующей активностью способны вызывать деструкцию строительных материалов на основе минеральных компонентов.

Литература

- Арашкова А. А., Гончарова И. А., Тригубович А. М., Шарич Т. В. Влияние биоцидов различной химической природы на микромицеты рода *Aspergillus* // Молодежь в науке – 2014: прил. к журн. «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». Минск : Беларуская навука, 2015. С. 10–13.
- Головина Т. А. Порча архивных документов грибами-деструкторами и методы их обезвреживания // Вестн. Челябин. гос. ун-та. Биология. 2015. Вып. 3. С. 94–98.
- Кулько А. Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. М. : МНПЦБТ, 2012. 160 с.
- Gugnani H. C. Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli* // Frontiers in Bioscience. 2003. N 8. P. 346–357.

РОЛЬ ГЛУТАТИОНА И ГУАНОЗИНТЕТРАФОСФАТА В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА ЦИСТЕИНА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ СИНТЕЗА БЕЛКА У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

К. В. Безматерных¹, Г. В. Смирнова¹,
А. В. Тюленев¹, О. Н. Октябрьский^{1,2}

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

²Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, e-mail: oktyabr@iegm.ru

В живых клетках L-цистеин используется для синтеза белка и глутатиона, и служит основным источником восстановленной серы для многих других органических молекул. Высокая окислительно-восстановительная активность сульфгидрильных групп остатков цистеина играет важную роль в изменениях конформации белка, активности ферментов, редокс-сигналикации и других метаболических процессах. Однако вследствие высокой реакционной способности свободный цистеин может восстанавливать внутриклеточное железо, способствуя протеканию реакции Фентона в присутствии H₂O₂ с образованием токсичных гидроксильных радикалов, которые в свою очередь вызывают окислительные повреждения ДНК и различных клеточных структур [Park, 2003; Imlay, 2015]. Кроме того, даже субтоксичные концентрации цистеина могут ингибировать некоторые ферменты синтеза аминокислот и нарушать рост бактерий. Для предотвращения этих негативных явлений, клетки должны осуществлять строгий регуляторный контроль и поддерживать низкий уровень внутриклеточного цистеина при различных изменениях условий окружающей среды. Недавно было показано, что выращенная на минимальной среде с сульфатом *E. coli* генерирует H₂S при ингибировании роста, вызванном истощением глюкозы, аминокислотным голоданием или воздействием некоторых антибиотиков, включая хлорамфеникол, тетрациклин и высокие дозы ципрофлоксацина [Tyulenev *et al.*, 2018]. Одновременно были обнаружены изменения в уровнях цистеина и глутатиона в голодающих клетках. Было предположено, что все эти изменения связаны с необходимостью поддержания гомеостаза цистеина в условиях резкого ингибирования синтеза белка.

Целью исследования было изучение вклада глутатиона и регуляторного нуклеотида (p)ppGpp, являющегося ключевым участни-

ком в метаболическом перепрограммировании бактерий при различных стрессах, в изменении уровня внутриклеточного и экстраклеточного цистеина при ингибировании синтеза белка, вызванного аминокислотным голоданием или добавлением хлорамфеникола.

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* BW25113 дикого типа и одиночные нокаутные мутанты JW2663 ($\Delta gshA$), JW2755 ($\Delta relA$) из Keio Collection. Двойной мутант NM4861 ($\Delta relA \Delta gshA$) был сконструирован путем трансдукции фагом P1 с использованием штаммов JW2663 ($\Delta gshA$) и JW2755 ($\Delta relA$). Бактерии выращивали в термостатируемом орбитальном шейкере при 150 об/мин и 37°C в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды M9 с 0,15 % глюкозы. Для остановки синтеза белка к культурам в экспоненциальной фазе роста добавляли 0,5 мг/мл валина или 25 мкг/мл хлорамфеникола. Количество внутри- и внеклеточного цистеина проводили методом Gaitonde [Gaitonde, 1967], модифицированным как описано ранее [Tyulenev et al., 2018]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1650PC (Япония) при длине светового пути кюветы 10 мм. Для определения концентрации цистеина в образцах использовали калибровочные кривые, построенные с использованием известных концентраций цистеина.

Исследования показали, что экспоненциально растущие культуры родительского штамма и мутантов *relA*, *gshA* и *relAgshA* имели близкие концентрации внутриклеточного цистеина ($0,13 \pm 0,02$ мкМ / ОП₆₀₀, что примерно соответствует 100 мкМ), которые поддерживались на постоянном уровне в течение всего времени культивирования. В клетках дикого типа концентрация внутриклеточного цистеина существенно не изменялась при воздействии валина и хлорамфеникола. Однако оба вещества нарушали гомеостаз цистеина у исследуемых мутантов. У всех изученных мутантов концентрация внутриклеточного цистеина возрастала в течение 30 мин, после чего стабилизировалась на новом уровне. При добавлении валина уровень внутриклеточного цистеина увеличивался в 1,6; 2,5 и 2,9 раза в клетках *relA*, *relAgshA* и *gshA* соответственно. Аналогичное повышение уровня цистеина наблюдалось в случае хлорамфеникола.

Концентрация внеклеточного цистеина на единицу биомассы поддерживалась на постоянном уровне в течение экспоненциального роста всех изученных штаммов ($0,34 \pm 0,03$ мкМ / ОП₆₀₀, что примерно соответствует 0,14 мкМ). Добавление валина ускоряло экспорт цистеина, который был более выражен у мутантов *gshA* и *relAgshA*. После 1 ч инкубации с валином внеклеточный уровень цистеина

увеличился в 4,4; 4,7; 5,5 и 6,5 раз по сравнению с исходным уровнем в штаммах дикого типа, *relA*, *relAgshA* и *gshA* соответственно. Хлорамфеникол также стимулировал выход цистеина из клеток, но в меньшей степени, чем валин.

Нарушение гомеостаза цистеина у мутантов *relA*, *relAgshA* и *gshA* приводило к повышению их чувствительности к пероксидному стрессу, вызванному добавлением 2 и 10 мМ H₂O₂. Выживаемость *gshA* мутанта при действии 10 мМ H₂O₂ снижалась на 3 порядка по сравнению с родительским штаммом.

Таким образом, исследование показало, что резкое ингибирование синтеза белка у бактерий *E. coli*, растущих на минимальной среде с глюкозой и сульфатом, сопровождается изменениями потоков цистеина. В клетках дикого типа внутриклеточный цистеин поддерживается на низком уровне из-за экспорта цистеина из клеток и включения его избытка в глутатион. Отсутствие глутатиона ускоряет выход цистеина и приводит к возрастанию его внутриклеточного уровня. Повышение концентрации регуляторного нуклеотида (p)ppGpp при строгом ответе способствует ингибированию синтеза цистеина, обеспечивая тем самым поддержание его гомеостаза в клетках. Обнаруженные у мутантов нарушения гомеостаза цистеина достаточны для повышения их чувствительности к пероксидному стрессу. Представляет интерес изучение роли гомеостаза цистеина в адаптации бактерий к другим стрессам, многие из которых сопровождаются ингибированием синтеза белка.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием 01201353249, поддержана грантом РФФИ 19-04-00888 и грантом Программы УрО РАН (номер госрегистрации АААА-А18-118041890005-1).

Литература

- Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // *Biochem. J.* 1967. Vol. 104. P. 627–633.
- Imlay K. R. C., Korshunov S., Imlay J. A. Physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2015. Vol. 197(23). P. 3629–3644.
- Park S., Imlay J. A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185(6). P. 1942–1950.
- Tyulenev A. *et al.* The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures // *Bioelectrochem.* 2018. Vol. 121. P. 11–17.

ОБЛИГАТНО АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ГРИБЫ В ЗАСОЛЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЯХ

С. А. Бондаренко^{1,2}, М. Л. Георгиева^{1,3}, Е. Н. Биланенко¹

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
г. Москва, e-mail: e_bilanenko@mail.ru

²Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва,
e-mail: bond.sonia@gmail.com

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе, г. Москва, e-mail: i-marina@yandex.ru

Грибы обладают высоким адаптационным потенциалом к различным абиотическим факторам, не уступая в этом экстремофильным бактериям и археям. Что касается отношения к фактору pH, большая часть культивируемых видов предпочитает для роста слабокислые условия. Изучение грибов, устойчивых к щелочным условиям, началось сравнительно недавно, на рубеже XX-XXI веков. Большой вклад в развитие этого направления внес ряд отечественных исследований микромицетов содовых озер и солончаков Кулундинской степи, Забайкалья, пустыни Гоби, Танзании [Grum-Grzhimaylo et al., 2016]. Благодаря селективным методам выделения была создана большая коллекция грибов, адаптированных к экстремальным условиям, описано 8 новых для науки видов, 2 рода и одна секция. Показано, что грибы характеризуются разными типами адаптации к высоким значениям pH: алкалотолеранты способны развиваться в щелочных условиях, но предпочитают более низкие значения pH среды (до 8); оптимум роста алкалофилов находится в щелочных условиях, алкалофилы могут быть как факультативными, так и облигатными (в зависимости от способности к росту при pH ниже 5–5,5). Если факультативные алкалофилы и алкалотолеранты распространены широко, встречаются даже в кислых и нейтральных почвах, то облигатные алкалофилы – крайне редкая группа грибов.

Явление облигатной алкалофилии известно только для двух родов аскомицетов – *Sodiomyces* (Plectosphaerellaceae, Sordariomycetes) и *Thielavia* (Chaetomiaceae, Sordariomycetes) [Grum-Grzhimaylo et al., 2016]. Наиболее интересен род *Sodiomyces* с видами *S. alkalinus* (отмечен в литоральной зоне содовых озер России, Монголии, Танзании), *S. magadii* и *S. tronii* с побережья содового озера Магади (Кения). Недавно новый вид *Sodiomyces* sp. nov. был отмечен нами на побережье хлоридного озера Баскунчак (Россия) (рис.). Обнаружение облигатных алкалофилов в условиях нейтрального засоления стало неожиданностью, до этого явление облигатной алкалофилии тесно связывали со стабильно щелочными условиями (pH 11–12).

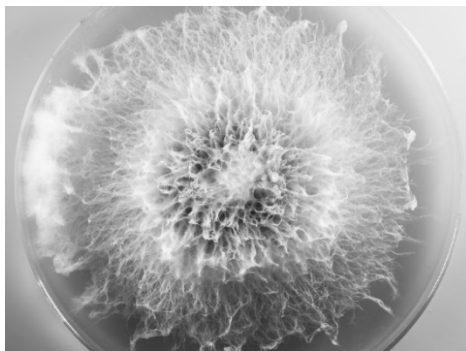


Рис. Общий вид колонии *Sodiomyces* sp. nov.
на щелочном агаре

Особенности морфологии и физиологии подтверждают, что грибы *Sodiomyces* способны переживать сильное засоление, постоянно чередующиеся условия засухи и затопления, образуя большое количество слизи, защищающей мицелий и споры, для них характерны замкнутые плодовые тела со своеобразным типом развития [Kozlova et al., 2019]. Биохимические исследования показывают, что облигатные алкалофилы обладают уникальным, не характерным для алкалотолерантов составом растворимых углеводов цитозоля – они накапливают большое количество трегалозы, которое сохраняется и в стрессовых условиях кислых pH [Бондаренко и др., 2018; Bondarenko et al., 2017]. Мы предполагаем, что грибы рода *Sodiomyces* – подходящие кандидаты на роль узкоспециализированных деструкторов органики в литоральной зоне озер разных типов засоления. *Sodiomyces* spp. могут входить в состав биопленок или быть ассоциированы с цианобактериальными матами, что косвенно подтверждается составом ферментов, в частности, высокой протеиназной активностью, наличием бактериальных генов в геноме [Grum-Grzhimaylo et al., 2019]. Защелачивание, которым сопровождается процесс фотосинтеза в матах и биопленках, могло бы объяснять присутствие облигатных алкалофилов в условиях нейтрального хлоридного засоления. Облигатно алкалофильные грибы представляют большой интерес для дальнейших экологических и эволюционных исследований и для решения прикладных задач по поиску ценных для человека вторичных метаболитов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-34-00779 мол_а, № 18-04-00488.

Литература

Бондаренко С. А., Януцевич Е. А., Сеницына Н. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н., Терёшина В. М. Динамика растворимых углеводов цитозоля и мембранных липидов в ответ на изменения внешнего pH у алкалофильных и алкалотолерантных грибов // Микробиология. 2018. Т. 87, № 1. С. 12–22.

Bondarenko S. A., Ianutsevich E. A., Danilova O. A., Grum-Grzhimaylo A. A., Kotlova E. R., Kamzolkina O. V., Bilanenko E. N., Tereshina V. M. Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // Extremophiles. 2017. Vol. 21. P. 743–754.

Grum-Grzhimaylo A. A., Georgieva M. L., Bondarenko S. A., Debets A. J. M., Bilanenko E. N. On the diversity of fungi from soda soils // Fungal Divers. 2016. Vol. 76, N 1. P. 27–74.

Grum-Grzhimaylo A. A., Falkoski D. L., van den Heuvel J., et al. The obligate alkalophilic soda-lake fungus *Sodiomyces alkalinus* has shifted to a protein diet // Mol Ecol. 2019. Vol. 27, N 23. P. 4808–4819.

Kozlova M. V., Bilanenko E. N., Grum-Grzhimaylo A. A., Kamzolkina O. V. An unusual sexual stage in the alkalophilic ascomycete *Sodiomyces alkalinus* // Fungal biology. 2019. Vol. 123, N 2. P. 140–150.

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА И СТРУКТУРЫ АНАЭРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С РАЗЛИЧНЫМИ БИОПОЛИМЕРНЫМИ И МЕТАНОГЕННЫМИ СУБСТРАТАМИ

С. В. Букин, В. Г. Иванов, Т. В. Погодаева,
А. С. Новикова, Т. И. Земская

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск
e-mail: sergeibukin@lin.irk.ru

Анаэробная деструкция органического вещества (ОВ) в донных отложениях пресноводных водоёмов – это многоэтапный процесс, осуществляемый узкоспециализированными, но тесно связанными между собой ассоциациями микроорганизмов. Среди её основных шагов можно выделить гидролиз полимеров, сбраживание мономеров, образование CO₂ и CH₄. Установление того, какую роль в деструкции выполняют обнаруживаемые в составе сообществ донных осадков микроорганизмы, является важной задачей современных исследований и ключом к пониманию механизмов функционирования биогеохимических циклов.

В настоящее время для донных отложений озера Байкал выполнен значительный объём работ, направленных на изучение скоростей различных этапов анаэробного разложения ОВ, определение расхода и потоков органического углерода [Намсараев, Земская, 2000; Пименов и др., 2014], а также установление филогенетическо-

го разнообразия микробных сообществ, населяющих осадки с различными физико-химическими характеристиками [Zemskaya et al., 2015; Lomakina et al., 2017; Zakharova et al., 2018]. В то же время, предположения о роли обнаруживаемых в сообществах филотипов зачастую основываются на физиологических возможностях их культивируемых представителей из других мест обитания или реконструкциях их метаболических путей на основе полных геномов.

Целью данного исследования было в условиях анаэробного культивирования выявить в сообществах донных отложений различных районов озера Байкал группы микроорганизмов, отвечающие за деструкцию полисахаридных (лигноцеллюлоза), белковых (желатин + пептон) и липидных (Твин 20 + Твин 80) биополимеров, а также группы, участвующие в утилизации конечных продуктов сбраживания – $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ и ацетата.

По результатам исследования установлено, что важную роль в сообществах, как на стадии деструкции биополимеров, так и при утилизации метаногенных субстратов могут играть различные некультивируемые филотипы, относимые к филумам *Firmicutes* и *Crenarchaeota*.

Исследования выполнены в рамках государственного задания (0345-2016-0007) и гранта РФФИ № 18-34-00435_мол_а.

Литература

- Намсараев Б. Б., Земская Т. И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000. 160 с.
- Пименов Н. В., Захарова Е. Е., Брюханов А. Л., Корнеева В. А., Кузнецов Б. Б., Турова Т. П., Погодаева Т. В., Калмычков Г. В., Земская Т. И. Активность и структура сообщества сульфатредуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83, № 2. С. 180–190.
- Lomakina A. V., Mamaeva E. V., Galachyants Y. P., Petrova D. P., Pogodaeva T. V., Shubenkova O. V., Khabuev A. V., Morozov I. V., Zemskaya T. I. Diversity of Archaea in the bottom sediments of the discharge areas with oil- and gas- bearing fluids in Lake Baikal // Geomicrobiol. J. 2017. Vol. 35, N 1. P. 50–63.
- Zakharova Y. R., Petrova D. P., Galachyants Y. P., Bashenkhaeva M. Y., Kurilkina M. I., Likhoshway Y. V. Bacterial and Archaeal Community Structure in the Surface Diatom Sediments of Deep Freshwater Lake Baikal (Eastern Siberia) // Geomicrobiology Journal. 2018. Vol. 35, N 8. P. 635–647.
- Zemskaya T. I., Lomakina A. V., Mamaeva E. V., Zakharenko A. S., Pogodaeva T. V., Petrova D. P., Galachyants Y. P. Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge // Aquat. Microb. Ecol. 2015. Vol. 76, N 2. P. 95–109.

ОБРАЗОВАНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ В БАЙКАЛЬСКИХ ШТАММАХ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ИХ РЕАКЦИЯ НА АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ

Е. В. Верхозина¹, В. А. Верхозина², В. В. Верхотуров²

¹Институт земной коры СО РАН, г. Иркутск, e-mail: verhel@crust.irk.ru

²Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, e-mail: verhval@mail.ru

Эндонуклеазы рестрикции (ЭР) II типа (рестриктазы) – один из самых больших классов ферментов (более 3500), способные узнавать в двухцепочечной ДНК короткую специфическую последовательность и расщеплять обе цепи ДНК внутри узнаваемой последовательности, используя в качестве кофактора ионы Mg^{2+} . Следует отметить, что разные ЭР используют различные механизмы для расщепления ДНК по двум цепям в зависимости от характера узнаваемой последовательности и наличия у них одного или двух каталитических центров [Юнусова А. К., 2006]. У прокариот эти ферменты обычно входят в состав систем рестрикции-модификации, основной функцией которых является защита клетки от чужеродной ДНК [Чернухин и др., 2003]. Очевидно, что актуальным также является изучение параметров биосинтеза этих ферментов в природных условиях. Несмотря на то что распределение рестриктаз в зависимости от выявляемых групп таксонов бактерий является очень слабо изученным, состав ЭР в природных источниках является одним из важнейших параметров, характеризующих экологические особенности популяций бактерий.

В ходе скрининга нами было проверено более 2500 штаммов бактерий из коллекции водных микроорганизмов на наличие в них ЭР. Продуценты рестриктаз, известные ранее лишь теоретически, были обнаружены в районах антропогенного влияния. Среди микроорганизмов оз. Байкал впервые обнаружены и идентифицированы новые штаммы-продуценты рестриктаз, выделенные в районах антропогенного влияния [Дедков и др., 1990]. В штамме *Arthromobacter* sp., выделенного из почвенных образцов, обнаружена эндонуклеаза рестрикции Asi2561, расщепляющая последовательность нуклеотидов 5'-GATC-3' [Гончар, Дедков, Верхозина, 1998].

Штамм бактерий *Flavobacterium aquatile* – продуцент рестриктазы FauI – был выделен из воды оз. Байкал в районе пос. Листвянка. Штамм бактерии *A. calcoaceticus* – продуцент рестриктазы AcaI – был выявлен в районе г. Байкальска. Вид *Acinetobacter calcoaceticus*

менее изучен, но продуцентов ферментов, способных расщеплять ДНК по последовательности CCA(N)₅ TGG до наших исследований в нем не обнаруживали. Штамм *Bacillus sphaericus* – продуцент рестриктазы BsiI, которая является новым ферментом среди рестриктаз, был выделен из этого же района. В истоке р. Ангары выделен штамм бактерии *Curtobacterium citrium*, продуцент CciNI, который является изошизомером NotI. Позже при изучении микроорганизмов водного происхождения нами обнаружен штамм *Sporosarcina* sp. 9D, являющийся продуцентом рестриктазы, названной Sse 91 согласно общепринятой номенклатуре.

Продолженные исследования по поиску ЭР (2005–2011 гг.) подтвердили, что исследуемые ферменты обнаруживаются в микроорганизмах, выделенных из проб воды в прибрежных районах п. Листвянка и г. Байкальска [Верхозина и др., 2014]. Полученные результаты встречаемости ферментов ЭР, обнаруженные в штаммах бактерий, выделенных из проб воды оз. Байкал в районах, испытывающих антропогенное влияние за период 2005–2011 гг. указывают на наличие рестриктазы HaeIII и XhoI, ClaI. Частота встречаемости остальных найденных рестриктаз составляет от 4 до 7 % (табл.). Следует отметить, указанные штаммы более продуктивны и являются перспективными в прикладном аспекте. В настоящее время ведутся их производственные испытания по достаточной продуктивности и доступности для биотехнологических разработок.

Таблица

Частота встречаемости ЭР, выявленных в штаммах бактерий, выделенных из проб воды оз. Байкал в районах антропогенного влияния 2005–2014 гг.

Прототип	Сайт узнавания	%	Таксономическая принадлежность бактерий
HaeIII-	5'-GGCC-3'	14	<i>Haemophilus sp.</i>
ClaI	5'-ATCGAT-3'	9	<i>Caryophano sp.</i>
PstI	5'-CTGCAG-3'	4	<i>Providencia sp.</i>
Bpu10I-	5'-CCTNAGC-3'	5	<i>Bacillus sp.</i>
Sau96I	5'-GGNCC-3'	7	<i>Staphylococcus sp.</i>
MboI	5'-GATC-3'	7	<i>Moraxella sp.</i>
EcoRII	5'-CCWGG-3'	5	<i>Escherichia coli</i>
XhoII	5'-RGATCY-3'	4	<i>Xanthomonas sp.</i>
BalI	5'-TGGCCA-3'	4	<i>Brevibacterium sp.</i>
XhoI	5'-CTCGAG-3'	9	<i>Xanthomonas sp.</i>
EcoRV	5'-GATATC-3'	4	<i>Escherichia coli</i>
BamHI	5'-GGATCC-3'	4	<i>Bacillus sp.</i>

Анализ многолетних исследований штаммов микроорганизмов – продуцентов ферментов эндонуклеаз рестрикции (ЭР) (рестриктаз), выделенных из экосистемы оз. Байкал, показал, что бактерии-продуценты ферментов ЭР, известные ранее лишь теоретически, обнаруживаются в штаммах бактерий, выделенных из проб воды, отобранных в антропогенных районах. В штаммах бактерий, выделенных из чистых участков озера: пелагиаль, донные осадки глубоководного бурения ЭР в штаммах бактерий не обнаружены.

Литература

Чернухин В. А., Голикова Л. Н., Гончар Д. А., Абдурашитов М. А., Каширина Ю. Г., Нетесова Н. А., Дегтярев С. Х. ДНК-метилтрансферазы M. BstF51-2 и M. BstF51-4 системы рестрикции-модификации BstSI из *Bacillus stearothermophilus* F 5 // Биохимия. 2003. Т. 68, № 9. С. 1183–1192.

Юнусова А. К., Рогулин Е. А., Артюх Р. И., Железная Л. А., Матвиенко Н. И. Белок, кодируемый открытой рамкой считывания, расположенной рядом с геном никазы BspD61, в комплексе с никазой образует эндоуклеазу рестрикции // Биохимия. 2006. Т. 71, № 7. С. 1002–1008.

Гончар Д. А., Дедков В. С., Верховина В. А. Эндонуклеаза рестрикции Sse91 из штамма *Sporosarcina* sp. 9D узнает последовательность 5'-AATT-3' // Молекулярная генетика. 1998. № 1. С. 32–34

Дедков В. С., Репин В. Е., Речкунова Н. И. Дегтярев С. Х., Верховина В. А. Выявление штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции среди водных микроорганизмов озера Байкал // Изв. Сиб. Отд. АН СССР. Сер. Биол. науки. 1990. № 1. С. 35–37.

Верховина В. А., Верховина Е. В., Гончар Д. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х., Чернухин В. А. Разработка и апробация физико-химических методов в экологических исследованиях // Вода: химия и экология. 2014. № 3. С. 66–70.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА NifA ВНУТРИ ГРУППЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

А. А. Владимирова, Р. С. Гуменко, Е. С. Акимова,
Ан. Х. Баймиев, Ал. Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского ФИЦ РАН, г. Уфа, e-mail: vladimirovaw@bk.ru

Клубеньковые бактерии представляют собой группу почвенных бактерий, способных преобразовывать атмосферный азот в аммиак, поскольку молекулярный азот является инертным для всех живых существ. Азот относится к одним из важнейших элементов необходимых для роста и развития живых организмов, так как он входит в состав нуклеиновых кислот, белков и других азотсодержащих компонентов [Крапп, 2015]. Процесс преобразования неусвояемой фор-

мы азота в доступную называется биологической азотфиксацией. Ризобии фиксируют данный элемент в специализированных структурах (клубеньках) на корнях бобовых растений, вступая с ними в симбиоз. Как у свободноживущих азотфиксирующих бактерий, так и у симбиотических регуляция процесса фиксации молекулярного азота находится под контролем комплекса *nif*-генов (от англ. *nitrogen fixation*) [Rubio, 2002]. Данный комплекс кодирует фермент нитрогеназу. Организация *nif*-генов у ризобий разных видов сильно варьирует. Эти гены локализованы либо на крупных симбиотических плаزمидях *pSym* (*Rhizobium*, *Ensifer*), либо в пределах хромосомных островков (*Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*). На данный момент известно, что симбиотические гены активно участвуют в горизонтальном переносе генов не только между штаммами одного вида, но и между бактериями разных таксонов [Andrews, 2018].

Белок NifA является основным транскрипционным активатором генов нитрогеназного комплекса у diaзотрофных бактерий, в том числе и у ризобий [Martinez, 2004]. Для исследования функциональной специфичности регуляторного белка NifA были использованы ранее созданные генно-инженерные конструкции, где целевым геном являлись варианты гена *nifA*, принадлежащие трем основным родам ризобий (*Rhizobium*, *Ensifer* и *Mesorhizobium*) под управлением индуцируемого промотора *ParaBAD*. Модифицированные бактерии были получены на основе диких штаммов клубеньковых бактерий отобранных из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН. Нитрогеназную активность у полученных рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий определяли ацетиленовым методом с использованием газового хроматографа (Shimadzu GC-2014, Япония). Было отмечено, что привнесение любого варианта активной копии гена *nifA* приводит к появлению азотфиксирующей активности *ex planta* по сравнению с дикими типами не имеющие таковой. Привнесение дополнительной копии вариантов гена *nifA* показало отсутствие строгой специфичности даже между штаммами одного вида. Так штаммы *V. syll* и *L. pis4* имели наибольшую активность с дополнительной копией гена *nifA* *Mesorhizobium* (0,12 мкг N₂/мл/ч и 0,07 мкг N₂/мл/ч, соответственно), в то время как привнесение собственной экспрессирующей копии (*nifA* *Rhizobium*) активировал процесс азотфиксации у штаммов *V. syl7* и *V. syl9* (0,11 мкг N₂/мл/ч и 0,27 мкг N₂/мл/ч, соответственно). Ацетиленредуцирующая способность была отмечена в меньшей степени (0,04–0,06 мкг N₂/мл/ч) под влиянием NifA *Ensifer* у бактерий рода *Rhizobium* и *Ensifer*, однако, проти-

воположный эффект был отмечен у штамма *L. zh1*, где показатель нитрогеназной активности составил 0,22 мкг N₂/мл/ч, что даже превышает показатель у контрольного свободноживущего штамма *Pseudomonas* sp. K749 (0,13 мкг N₂/мл/ч). В том числе была проведена работа по подбору концентраций индуктора для промотора *ParaBAD*, наиболее эффективной оказалась концентрация соответствующая 1,5 mM арабинозы. Для проверки влияния активатора NifA на запуск нитрогеназной системы оценивали наработку корового белка нитрогеназы NifH у исследуемых модифицированных штаммов с использованием поликлональных куриных антител к данному белку, с последующей обработкой вторичными кроличьими антителами, меченными пероксидазой хрена (Agrisera, Швеция). Было показано, что все рекомбинантные штаммы продуцировали белок NifH в не зависимости от наличия в среде индуктора. Таким образом, можно сделать предположение, что белок NifA имеет варибельную функциональную специфичность как внутри одного вида, так и между клубеньковыми бактериями различных родов.

Работа подготовлена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-020201 p_a (подбор штаммов для анализа), № 18-34-00034 мол_a (получение рекомбинантных штаммов), гранта УМНИК № 12605ГУ/2017 (анализ нитрогеназной активности).

Литература

Andrews M., De S. M., James E. K. et al. Horizontal Transfer of Symbiosis Genes within and Between Rhizobial Genera: Occurrence and Importance // *Genes*. 2018. Vol. 9, N 7. P. 1–24.

Krapp A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces // *Current opinion in plant biology*. 2015. Vol. 25. P. 115–122.

Martínez M., Palacios J. M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T. Symbiotic autoregulation of *nifA* expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Journal of bacteriology*. 2004. Vol. 186, N19. P. 6586–6594.

Rubio L. M., Ludden P. W. The gene products of the *nif* regulon // *Nitrogen fixation at the millennium*. Elsevier Science BV. 2002. P. 101–136.

АДАПТАЦИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОВЕРХНОСТНОГО МИКРОСЛОЯ ВОДЫ К ЭКСТРЕМАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЛНЕЧНОЙ РАДИАЦИИ

А. Д. Галачянц, Г. В. Подлесная,
И. В. Тихонова, О. И. Белых

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
e-mail: agniagal@lin.irk.ru

Водный поверхностный микрослой (ПМС) является физической границей между гидросферой и атмосферой. ПМС характеризуется незначительной толщиной, не превышающей нескольких десятков микрометров, тем не менее, он резко отличается от водной толщи по физико-химическим характеристикам [Zhang et al., 2003] и обуславливает формирование специфического сообщества микроорганизмов, называемого нейстоном. В связи с особенностями расположения ПМС подвержен сильному влиянию климатических и погодных явлений, в первую очередь воздействию солнечной радиации, в том числе ультрафиолетового (УФ) излучения. УФ-В излучение (длина волны 290–400 нм) повреждает ДНК бактерий, что в конечном итоге может приводить к гибели клетки. Тем не менее, численность бактерий в ПМС высока и даже превышает таковую в планктоне [Agogue et al., 2004], что свидетельствует о приспособленности нейстонных сообществ к создающимся экстремальным условиям. Ранее было высказано предположение, что на УФ-резистентность микробных сообществ оказывают влияние абиотические факторы окружающей среды [Santos et al., 2014].

На озере Байкал в августе 2018 г. в период летней стратификации выявлены значимые различия между содержанием фосфатов, общего азота, общего фосфора и общего органического углерода между ПМС и подповерхностным слоем воды (ПС) (тест Манна – Уитни – Вилкоксона, $p < 0,05$), что свидетельствует об обогащении поверхностного микрослоя биогенными элементами и органическими веществами (табл.). Эти соединения обеспечивают бактериальные клетки необходимыми элементами для синтеза белков, участвующих в репарации поврежденной УФ-радиацией ДНК, а также для запасаания энергии в виде АТФ. Кроме того, в августе ПМС отличался от ПС повышенной мутностью, т. е. большим содержанием взвешенных частиц. Эти частицы могут поглощать или отражать солнечный свет, таким образом защищая бактериальные клетки от

воздействия УФ-излучения. Все эти факторы свидетельствуют о наличии в ПМС условий, обеспечивающих защиту и благоприятствующих восстановлению бактерий после повреждающего воздействия УФ.

Таблица

Содержание химических веществ в ПМС и ПС оз. Байкал в августе 2018 г.

Слой воды	PO_4^{3-} , мг/дм ³	NO_3^- , мг/дм ³	Р общ., мг/дм ³	N общ., мг/дм ³	ТОС, мг/дм ³	Мутность, ЕМФ
ПМС	0,005±0,003	0,10±0,03	0,019±0,003	0,23±0,03	6,0±2	19,0±0,6
ПС	0,002±0,001	0,10±0,03	0,008±0,0003	0,10±0,01	2,0±0,1	8,0±0,2

Примечание. Общ. общий; ТОС – общий органический углерод; данные представлены в виде М±m.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0345-2019-0003 (АААА-А16–116122110061-6) «Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем...», № 0345-2019-0008 (АААА-А16–116122110065-4) «Оценка и прогноз экологического состояния озера Байкал...», проекта РФФИ № 18-34-00309 (учет общей численности бактерий).

Литература

Agogue H., Casamayor E. O., Joux F., Obernosterer I., Dupuy C., Lantoin F., Catala P., Weinbauer M. G., Reinthaler T., Herndl G. J., Lebaron P. Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer // *Limnol. Oceanogr. Methods*. 2004. N 2. P. 213–225.

Santos A. L., Baptista I., Gomes N. C. M., Henriques I., Almeida A., Correia A., Cunha A. Contribution of chemical water properties to the differential responses of bacterioneuston and bacterioplankton to ultraviolet-B radiation // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014. Vol. 87, N 2. P. 517–535.

Zhang Z., Liu L., Liu C., Cai W. Studies on the sea surface microlayer. II. The layer of sudden change of physical and chemical properties // *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 264, N 1. P. 148–159.

**РОЛЬ ОСМОЛИТОВ И ЛИПИДОВ В АДАПТАЦИИ
К ВНЕШНЕМУ pH И ХЛОРИДУ НАТРИЯ
У ГАЛОАЛКАЛОТОЛЕРАНТНОГО МИКРОМИЦЕТА
*EMERICELLOPSIS ALKALINA***

О. А. Данилова¹, Е. А. Януцевич¹, С. А. Бондаренко^{1,2},
М. Л. Георгиева², Д. А. Викчиганина³, Н. В. Гроза³,
Е. Н. Биланенко², В. М. Терёшина¹

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

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

³МИРЭА – Российский технологический университет, г. Москва,
e-mail: groza-nv@gmail.com

Экстремофильные грибы привлекают к себе внимание исследователей в качестве объекта для изучения механизмов адаптации организмов к экстремальным условиям окружающей среды. Известно, что у грибов основные адаптационные механизмы направлены на стабилизацию мембран и включают в себя синтез осмолитов (сахаров и полиолов), а также изменение состава мембранных липидов. Помимо значения для фундаментальных исследований, экстремофильные грибы представляют интерес для биотехнологии в качестве продуцентов многих биологически активных веществ, таких как ферменты, антибиотики, каротиноиды.

Данная работа посвящена изучению роли осмолитов и мембранных липидов в адаптации к стрессорным воздействиям осмотического и pH факторов у галоалкалотолерантного микромицета *Emericellopsis alkalina*, являющегося перспективным продуцентом антибиотиков.

Исследование роста *E. alkalina* в поверхностной культуре показало, что гриб способен расти с высокой скоростью в широком диапазоне pH (4–11) и концентраций хлорида натрия (0,2–2,0 М), при этом оптимальными являются условия – pH 10,2 и 0,4 М NaCl в среде. Таким образом, по типу устойчивости к pH и осмотическому фактору исследуемый гриб относится к сильным галоалкалотолерантам.

Изучение состава растворимых углеводов цитозоля гриба показало, что в оптимальных условиях (pH 10,2) основными сахарами являются арабит (50 % от суммы) и маннит, тогда как эритрит и трегалоза являются минорными. В динамике роста *E. alkalina* (3–10 сут.) углеводы цитозоля составляли 8–12 % от сухой биомассы. С увеличением возраста культуры доминирующим углеводом становится маннит на фоне снижения уровня арабита. Сходная тенденция

наблюдается при снижении pH. При этом во всем диапазоне значений pH общее количество углеводов варьирует в пределах 9-14 % от сухой биомассы. При увеличении концентрации хлорида натрия до 1.5 М общее количество углеводов возрастает в три раза, что вызвано резким повышением уровня эритрита (до 11-14 % от сухой биомассы) на фоне заметного снижения количества арабита и маннита. Такая смена доминирующих углеводов маннита и арабита на эритрит (90 % от суммы и 9 % от сухой массы) указывает на важность именно этого полиола для адаптации к осмотическому воздействию.

Основными мембранными липидами гриба в оптимальных условиях являются фосфолипиды (ФЛ), сфинголипиды (СЛ) и стерины (Ст). Доминирующие ФЛ представлены фосфатидными кислотами (ФК), фосфатидилэтаноламинами (ФЭ) и фосфатидилхолинами (ФХ). В динамике роста гриба *E. alkalina* снижается доля ФК на фоне повышения долей Ст и СЛ. При понижении pH среды происходит небольшое повышение доли ФК и снижение доли Ст. При увеличении концентрации соли немного увеличивается доля ФХ и снижается доля Ст.

Таким образом, показана ключевая роль осмолитной системы в процессе адаптации гриба к внешнему pH (путем изменения соотношения арабита и маннита в цитозоле клетки) и осмотическому фактору (путем накопления эритрита), тогда как мембранные липиды в этом процессе не участвуют.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДНОЙ ТОЛЩИ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ ОЗ. БАЙКАЛ

А. С. Захаренко, В. Г. Иванов, Т. И. Земская

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: zakharenko@lin.irk.ru

Методом высокопроизводительного массового параллельного секвенирования на платформе Illumina MiSeq с использованием праймеров на регион V3-V4 гена 16S rRNA изучен таксономический состав бактериальных сообществ водной толщи в трёх районах оз. Байкал. Исследованы сообщества в районе грязевого вулкана Большой, нефте-метанового сипа Горевой Утёс и мелководного метанового сипа Голоустное. В районе нефте-метанового сипа преобладали

бактерии рода *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*). Представители данного рода часто выделяли из нефтезагрязненных почв, поскольку они способны разлагать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [Liu Y et al., 2004; Chaudhary and Kim, 2016; Zhou et al., 2016]. По данным Горшкова с соавторами [2010], в этом районе озера Байкал из донных отложений в водную толщу поступают высокие концентрации нефтяных углеводородов, в том числе ПАУ. В районе метанового сипа Голоустное доминировали (до 54 %) представители фило *Actinobacteria*, ближайшими гомологами которых являлись некультивируемые бактерии из водной толщи Балтийского моря. В сообществах района грязевого вулкана Большой до глубины 100 м преобладали последовательности цианобактерий, что соответствует температурному режиму, наблюдаемому в данный период в этом районе. В глубинных слоях доминировали некультивируемые представители филума *Planctomycetes*, участвующие в цикле азота и являющиеся одними из основных деструкторов полимеров в оз. Байкал, по данным, полученным ранее [Cabello-Yeves et al., 2018]. Кроме того, в придонной области выявлено большое количество последовательностей метанотрофных бактерий I типа порядка *Methylococcales* (*Gammaproteobacteria*). Ближайшими гомологами многочисленной ОТЕ метанотрофов, которая на филогенетическом дереве образует отдельный кластер, являлись некультивируемые бактерии, выделенные из озер Байкал (KF791117) и Йеллоустон (EU340166). Основная часть последовательностей метанотрофов выявлена в глубинных образцах водной толщи районов грязевого вулкана и метанового сипа оз. Байкал, в районе нефте-метанового сипа метанотрофы обнаружены в единичных количествах.

Таким образом, в водной толще районов разгрузки нефтяных и газообразных углеводородов оз. Байкал процентное соотношение таксонов в сообществах данных районов было различным. Наибольшие различия выявлены на уровне рода.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме 0345-2019-0007 и гранта РФФИ № 18-34-00442 мол_а.

Литература

- Liu Y, Zhang J, Zhang Z. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5 // Biodegradation. 2004. Vol. 15, N 3. P. 205–212.
- Chaudhary DK, Kim J. *Sphingomonas naphthae* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. // Int J Syst Evol Microbiol. 2016. Vol. 66, N 11. P. 4621–4627.
- Zhou L, Li H, Zhang Y, Han S, Xu H. *Sphingomonas* from petroleum-contaminated soils in Shenzhou, China and their PAHs degradation abilities // Braz J Microbiol. 2016. Vol. 47, N 2. P. 271–278.

Горшков А. Г., Мариняте И. И., Земская Т. И., Ходжер Т. В. Современный уровень нефтепродуктов в воде озера Байкал и его притоков // Химия в интересах устойчивого развития. 2010. Т. 18. С. 711–718.

Cabello-Yeves P. J., Zemskaya T. I., Rosselli R., Coutinho F. H., Zakharenko A. S., Blinov V. V., Rodriguez-Valera F. . Genomes of Novel Microbial Lineages Assembled from the Sub-Ice Waters of Lake Baikal // Appl. Environ. Microbiol. 2018. Vol. 84, N 1. e02132–17.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА НА СКОРОСТЬ РОСТА ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЭПИЛИТИЧЕСКИХ БИОПЛЕНОК ОЗЕРА БАЙКАЛ

Е. А. Зименс, Е. В. Суханова

Лимнологический институт Сибирского отделения РАН,
г. Иркутск, e-mail: ekaterinasiemens93@gmail.com

Микробное сообщество эпиплитических биопленок состоит из большого числа видов, которые играют ключевую роль в функционировании экосистемы, являясь основными местами круговорота углерода, азота и других органических и неорганических веществ [Battin et al., 2003]. Быстро адаптируясь к меняющимся условиям, микробное сообщество биопленок активно участвует в процессах самоочищения, что способствует поддержанию стабильности природных экосистем [Costerton et al., 1987]. Цель данной работы – определить способность утилизировать различные органические субстраты и оценить влияние концентрации органического вещества на скорость роста гетеротрофных бактерий, изолированных из эпиплитических биопленок озера Байкал.

Объектом исследования стала коллекция гетеротрофных штаммов бактерий (377 штаммов), изолированных из эпиплитических биопленок, губок и водной толщи озера Байкал. Исследуемые штаммы были протестированы на наличие способности утилизировать различные субстраты (п-нитрофенилфосфат, яичный агар, крахмал, казеин, трибутирин, желатину), а также на внеклеточные ферменты каталазу и оксидазу. Для выявления зависимости скорости роста гетеротрофных бактерий от концентрации органических веществ готовили четыре жидких питательных среды, г/л: ПДС 0,01 % (0,01 г/л), NSY (3,0 г/л), LB (15,0 г/л) и МПБ (24 г/л). Взято 5 штаммов, относящихся к разным таксономическим группам: *Pseudomonas* и *Aeromonas* (гаммапротеобактерии), *Rhizobium* (альфапротеобактерия),

Bacillus (вибрикуты) и *Kocuria* (актинобактерии). Колбы с посевами помещали на орбитальный шейкер 160 об/мин при комнатной температуре. Измерение оптической плотности проводили каждые 4 ч в течение 68 ч по мере перехода культуры в стадию отмирания на фотоэлектрическом колориметре при длине волны 590 нм (КФК-2-УХЛ 4.2, Россия).

Определение ферментативной активности гетеротрофных бактерий из водной толщи и эпилитических биопленок показало сопоставимый процент штаммов, обладающих липазной, амилазной и протеолитической активностью. При этом больший процент штаммов, изолированных из биопленок, обладал фосфатазной и оксидазной активностью, а также способностью растворять труднорастворимые соединения фосфора (K_2HPO_4) (табл.). Сравнительный анализ способности к утилизации органических соединений штаммов, выделенных из губок, показал, что у штаммов из здоровых губок выше липазная активность (трибутирин, лецитин), чем у штаммов, выделенных из биопленок и воды, но при этом ниже амилазная и оксидазная активность. У штаммов, выделенных из больных губок, отмечен высокий процент всех изученных ферментативных активностей по сравнению с другими экотопами. Высокий процент штаммов с липазной активностью свидетельствует о процессах разложения органических веществ в больных губках.

Таблица

Доля штаммов гетеротрофных бактерий,
утилизирующих органические субстраты, %

Ферменты	Субстраты	Биопленки	Вода	Губки	
				Здоровые	Больные
Протеаза	казеин	53	56	57	62
	желатина	57	58	43	50
Липаза	лецитин	40	40	53	72
	трибутирин	6	6	11	28
Фосфатаза	<i>n</i> -нитрофенил-фосфат	82	75	69	90
	фенолфталинфосфат натрия	33	36	15	34
Амилаза	крахмал	33	35	21	62
Оксидаза	Oxitest Microlatest*	39	33	10	57
Каталаза	перекись водорода	93	100	100	100
Кислоты и др. вещ-ва	K_2HPO_4	51	42	46	38
Кол-во штаммов, шт.		184	115	28	50

Примечание: * Oxitest Microlatest (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехия).

Показано, что штамм *Aeromonas* sp. 69–09 имел самую высокую скорость роста на питательных средах NSY, МПБ, LB и максимальные значения оптической плотности культуры (ОП = 1,8). В стационарную фазу культура перешла через 13–23 ч от начала эксперимента.

Штамм *Bacillus* sp. 1–09 также показал максимальные значения скорости роста, однако оптическая плотность была ниже на всех использованных средах (ОП = 1,4). На средах с минимальным количеством органических веществ (0,01 % ПДС) скорость роста этих штаммов была ниже в два раза. Скорость роста клеток штамма *Pseudomonas* sp. 100–09 была ниже, стационарная фаза культуры отмечена через 23–48 ч, максимальная оптическая плотность зафиксирована на средах LB и МПБ (ОП = 1,4), минимальная – на олиготрофной среде ПДС (ОП = 0,5). Для штамма *Rhizobium* sp. 57–09 определена низкая скорость роста (через 56 ч), однако плотность клеток была высокая на МПБ и NSY (ОП = 1,8 и 1,6), на среде ПДС (ОП = 0,5), отмечено отсутствие роста на среде LB. Штамм *Kocuria* sp. 143–09 проявил также низкую скорость роста (через 56 ч) на средах ПДС, МПБ и LB, а на среде NSY время выхода в стационарную фазу роста достигало 60 ч (ОП = 1–1,8).

Таким образом, большой процент штаммов, способных утилизировать различные органические субстраты, выделены из больных губок. В эпиплитических биопленках отмечено преобладание штаммов с фосфатазной активностью по сравнению с водной толщей и здоровыми губками. Показано, что штаммы *Aeromonas* и *Bacillus* обладают высокой деструктивной активностью, а также определено, что скорость роста бактерий родов *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Kocuria* и *Rhizobium* достоверно различается на питательных средах с низким и высоким содержанием органических веществ.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0345-2016-0003 (АААА-А16–116122110061–6) «Микробные и вирусные сообщества в биопленках ...» и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00443.

Литература

Battin T. J., Kaplan L. A., Newbold J. D., Hansen C. E. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms // Nature. 2003. Vol. 426. P. 439–442.

Costerton W., Cheng K. J., Geesey G. G. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease // Annu Rev Microbiol. 1987. Vol. 41. P. 435–464.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ФУНГИЦИДНЫХ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ НА РАЗВИТИЕ ГРИБА РОДА *TRICHODERMA*

С. Д. Каракотов, К. Н. Божко, С. Н. Масленникова

АО «Щелково Агрохим», г. Щелково, Московская область,
e-mail: bozhko@betaren.ru

В связи с развитием направления биологизации земледелия весьма актуален вопрос сохранения полезной микрофлоры в почве при использовании современных фунгицидных протравителей. Существует мнение, что вещества, используемые для контроля болезней полевых культур, способствуют обеднению почвенного микробиома, снижая супрессивность почв. Грибы рода *Trichoderma* относятся к полезной микрофлоре, и их наличие служит диагностическим признаком при оценке состояния почвенного микробиома и плодородия.

Цель данного исследования – оценка влияния действующих веществ фунгицидных протравителей, вносимых в почву вместе с обработанным зерном, на рост почвообитающего гриба рода *Trichoderma*. В работе использовали гриб *Trichoderma atroviride* SC1, выделенный из препарата Vintec Biba (Бельгия).

Для создания модели проращивания протравленного зерна в почве, содержащей полезную микрофлору, был проведен модельный опыт в условиях *in vitro*. Для этого семена пшеницы сорта Скэнт-3 (РС-2) протравливали следующими действующими веществами: тебуконазол (30 г/т), прохлораз (50 и 150 г/т), флудиоксонил (50 г/т); расход рабочей жидкости – 10 л на 1 т семян. На застывшую двухслойную питательную среду КСА, во второй слой которой вводили суспензию гриба *Trichoderma atroviride* SC1, раскладывали по 15 протравленных семян. Вводимое количество спор и мицелия гриба приближено к средним показателям содержания триходермы в дерново-подзолистых окультуренных почвах, что соответствовало $3,1 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы. Посевы инкубировали в термостате 7 сут. при 27°C.

Результаты опыта выявляют нормальное развитие триходермы в присутствии протравленного зерна прохлоразом в обеих дозировках и тебуконазолом, а в варианте с флудиоксонилом отмечается ингибирование роста триходермы (рис.).

Оценивали влияние протравленного зерна на развитие грибов р. *Trichoderma* (почвенный опыт). В почвенный субстрат (торфогрунт) искусственно вносили суспензию спор и мицелия *Trichoderma atroviride* SC1 с конечным содержанием 10^6 КОЕ/г субстрата. В сосуды

с полученным торфогрунтом высевали по 4 семени, протравленных определенным действующим веществом; в контроле семена обрабатывали дистиллированной водой. Повторность опыта 3-кратная. Посевы выращивали при 16-часовом световом дне и постоянной температуре 24°C. Через 17 сут. из каждого варианта отбирали пробы почв, проводили ряд последовательных разведений и поверхностно высевали на питательную среду КСА. Посевы культивировали при 27 °С 4 сут., после чего подсчитывали количество выросших колоний триходермы. Результаты анализа представлены в таблице.

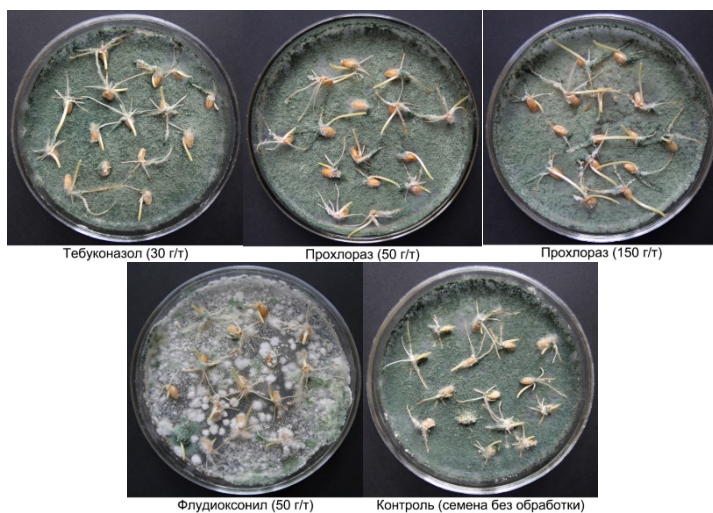


Рис. Влияние зерна, протравленного различными ДВ, на развитие гриба *Trichoderma atroviride* SC1

Таблица
Динамика изменения численности триходермы в почвенном субстрате с протравленным зерном

Вариант	Содержание <i>Trichoderma atroviride</i> , КОЕ/г субстрата	
	Перед посевом	17-е сутки
Контроль	4,7 · 10 ⁶	2,7 · 10 ⁶
Прохлораз (50 г/т)		3,4 · 10 ⁶
Прохлораз (150 г/т)		3,0 · 10 ⁶
Флудиоксонил (50 г/т)		2,9 · 10 ⁶
Тебуконазол (30 г/т)		1,3 · 10 ⁶

Оценка влияния протравленного зерна на количество триходермы в почве не выявило значимых различий в анализируемых вариантах (достоверность различий оценивались по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$)).

В модельном опыте *in vitro* с протравленными семенами наблюдается ингибирующее действие на развитие триходермы от флудиоксонила и отсутствие какого-либо влияния прохлораза, что может быть объяснено разным характером распространения ДВ внутри растения: прохлораз – контактный и системный фунгицид, флудиоксонил является контактным фунгицидом и имеет слабое системное действие. Именно поэтому флудиоксонил, оставаясь на поверхности семени и не проникая внутрь, ингибирует развитие триходермы как на питательной среде, так и на поверхности протравленного зерна; а прохлораз, проникая внутрь, не оказывает существенного влияния на рост триходермы, которая нормально развивается как в питательной среде, так и на поверхности зерна и корневой системы.

Однако при проведении модельного почвенного опыта не было выявлено статистически значимого губительного влияния протравленного зерна на численность триходермы во всех анализируемых вариантах.

Предположительно все ингибирующие эффекты от фунгицидов могут иметь место в ризосфере растений, размеры которой составляют не более 0,8-1 см от прикорневой зоны почвы; либо при многократном превышении норм расхода препаратов, но этот эффект вероятнее всего будет наблюдаться так же в ризосфере, а не по всей площади почвенного профиля.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У БАКТЕРИЙ

И.Ф. Каримов, Н.А. Куликова, К.С. Кондрашова
Оренбургский государственный университет, г. Оренбург,
e-mail: ifkarimov@yandex.ru

Переход бактерий к жизни в аэробной среде привел к необходимости сформировать системы защиты от метаболитов кислорода, обладающих повышенной реакционной способностью. Обезвреживание супероксид аниона осуществляется специализированными металлоферментами - супероксиддисмутазами, экспрессия которых происходит в составе *soxRS* регулона, где *soxR* кодирует воспринимающий O_2^- рецепторный белок, запускающий синтез транскрипционного активатора SoxS [Pomposiello et al., 2001]. За разложение пероксида водорода отвечает бактериальная

каталаза, кодируемая геном *katG* и индуцируемая другим транскрипционным регулятором - ОхуR [Wei et al., 2012]. Наконец, в отсутствие специфической системы защиты от гидроксил-радикала, репарация нанесенных им окислительных повреждений ДНК происходит с участием SOS-системы [Janion, 2008].

Удобным инструментом исследования данного вопроса представляются индуцибельные бактериальные биосенсоры, несущие плазмиды с *luxCDABE*-генами, клонированными под контролем стрессовых промоторов. Это определяет низкий фоновый уровень бактериального свечения, усиливающийся при синхронной транскрипции как самих генов защиты от окислительного стресса, так и находящихся под контролем их промоторов генов биолюминесценции [Манухов и др., 2008], что позволило оценить окислительный потенциал наночастиц [Завигельский, 2011].

Нами было проведено сравнение основных параметров люминесцентного отклика *lux*-биосенсоров с плазмидами *pSoxS':::lux*, *pKatG':::lux* и *pRecA':::lux*, клонированных в клетках хозяйских штаммов *Escherichia coli* K12 MG1655 и *Salmonella typhimurium* LT2, при воздействии эндогенных и экзогенных АФК и РФА. В качестве контроля использован штамм *E.coli* K12 MG1655, трансформированный плазмидой *pXen7* с конститутивным типом свечения.

Индукция плазмиды *pSoxS':::lux* была наиболее выраженной при воздействии супероксид аниона, причем с преимущественной реакцией на эндогенно возникающий $O_2^{\cdot -}$ по сравнению с экзогенным. Развитие свечения также обнаружено в присутствии экзогенных H_2O_2 , OCI^- и, особенно, $NO^{\cdot}$. Установлена более выраженная индукция плазмид *pSoxS':::lux* в клетках *S. typhimurium* LT2 по сравнению с *E. coli* K12 MG1655, что соответствует представлениям о важности ответа на окислительный и нитрозирующий стресс в экологии бактериальных патогенов. Индукция плазмиды *pKatG':::lux* в первую очередь определялась присутствием в среде пероксида водорода, но также могла быть вызвана воздействием экзогенного $O_2^{\cdot -}$. Штаммы с плазмидой *pRecA':::lux* также отреагировали на пероксид водорода и его смесь с перхлоратом железа, обеспечивающего реакцию Фентона.

Антиоксидантная защита может быть обеспечена также ферментными системами, в частности витаминами, хинонами и другими молекулярными ловушками. В этом контексте нами обнаружена собственная прооксидантная активность подобных соединений, в частности тиамин с выраженной специфичностью осуществлял активацию генов окислительного стресса у *S. typhimurium* LT2 с плазмидой *pSoxS':::lux*, тогда как ответ от *E. coli* MG1655 не был обнаружен, что

обусловлено особенностями структуры рецепторных систем. Действие пиридоксина характеризовалось более широким спектром активации генов окислительного стресса, но меньшими величинами индукции люминесценции, а также проявил генотоксические свойства, которые регистрировались по увеличению свечения штаммов с плазмидами *pRecA':::lux*. Аскорбиновая кислота в этом биотесте продемонстрировала выраженные прооксидантные и токсические свойства, обусловленные, в первую очередь, использованием более высоких концентраций по сравнению с другими соединениями.

Впоследствии нами была установлена способность некоторых видов антибиотиков, в частности ампициллина, бициллина, цефалексина и канамицина обеспечивать индукцию промотора *soxS*, но не *katG*, при использовании выше описанных репортерных люминесцирующих штаммов бактерий. Причем активация преимущественно характерна для биосенсоров на основе *S. typhimurium* LT2, несмотря на сходную степень задержки роста штаммов, а максимальная экспрессия указанного гена наблюдалась при субингибиторных концентрациях.

Также была изучено развитие окислительного стресса у бактерий в биологических системах, опосредованных фагоцитирующими клетками человека. Выраженная реакция штаммов с плазмидой *pSoxS':::lux* была зафиксирована при их взаимодействии с системой окислительного метаболизма моноцитов. Однако действие гранулоцитов на *lux*-биосенсоры с плазмидой *pKatG':::lux* характеризовалось наиболее сильным люминесцентным откликом на образуемые данными клетками АФК и РФА. Отдельный аспект полученного результата был связан с обнаружением при контакте с гранулоцитами индукции плазмиды *pRecA':::lux*, что свидетельствует в пользу развивающегося в данных условиях «прорыва» систем антиоксидантной защиты бактериальных клеток, ведущего к окислительному повреждению их генетического аппарата.

Таким образом, цикл исследований показал характер развития окислительного стресса у бактерий при воздействии на них абиотических факторов различной природы, а также клеточных биологических систем. При этом использование информации об активности различных ключевых промоторов и жизнедеятельности клетки в целом позволяет установить механизмы действия активных форм кислорода и азота на системы антиоксидантной защиты бактерий.

Литература

- Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli* // International Journal of Biological Sciences. 2008. V.4(6). P.338-344.
Pomposiello P.J., Bennik M.H., Demple B. Genome-wide transcriptional profiling of the

Escherichia coli responses to superoxide stress and sodium salicylate // J. Bacteriol. 2001. V.183. P.3890-3902.

Wei Q., Le Minh P.N., Dutsch A., Hildebrand F., Panmanee W., Elfarash A., Schulz S., Plaisance S., Charlier D., Hassett D., Haussler S., Cornelis P. Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen // Nucl. Acids Res. 2012. doi: 10.1093/nar/gks017.

Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. Наночастицы диоксида титана (TiO₂) индуцируют в бактериях стрессовые реакции, фиксируемые специфическими *lux*-биосенсорами // Российские нанотехнологии. 2011. Т.6. С.130-133.

Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальдов Д.Г., Ильцев А.В., Бельков А.П. Завильгельский Г.Б. Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с цисплатиной // Микробиология. 2008. Т. 77. №5. С.590-597.

ИНДУКЦИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ КАТИОННЫМ ПЕПТИДОМ СЕМЕЙСТВА ЛАНТИБИОТИКОВ ВАРНЕРИНОМ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* К ПОЛИМИКСИНАМ

В.П.Коробов^{1,2}, Л.М.Лемкина¹, Т.В.Полудова^{1,3}

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

²Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, г. Пермь

³Пермский государственный аграрно-технологический университет
им. академика Д. Н. Прянишникова, г. Пермь

Быстрое формирование резистентности патогенной микрофлоры к вводимым в клиническую практику антибиотикам определяет необходимость перманентного поиска новых эффективных антибактериальных соединений, способных самостоятельно или совместно с известными антибиотическими препаратами подавлять развитие болезнетворных бактерий [Field et al, 2015].

В этой связи, были проведены экспериментальные исследования совместного действия некоторых полимиксиновых антибиотиков (группы В и М) и выделенного нами [Коробов с соавт., 2003] из сред культивирования бактерий *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 нового низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков варнерина на клинические штаммы *E.coli* и коллекционный штамм *E.coli* ATCC25922. Результаты исследований представлены в таблице. Как видно из полученных данных, МПК полимиксина группы В для коллекционного штамма составляла 0,15 мкг/мл, для трех клинических штаммов – 1,25 мкг/мл, а два штамма были к этому антибиотику не чувствительны. МПК полимиксина М для *E.coli* ATCC 25922 и двух клинических штаммов были равны 2,5 мкг/мл, а три штамма проявляли полную резистентность к этому варианту антибиотика.

Таблица

Штаммы бактерий	МПК, мкг/мл		МПК, мкг/мл	
	Полимиксин В	Полимиксин В + варнерин	Полимиксин М	Полимиксин М + варнерин
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,15	0,078	2,5	0,625
№26	Резистентный	0,156	Резистентный	0,625
№50	1,25	0,04	2,5	0,625
№52	1,25	0,04	2,5	0,625
№63	1,25	0,625	Резистентный	Резистентный
№66	Резистентный	0,08	Резистентный	2,5

Исследования ожидаемо показали, что варнерин, как это характерно для всех известных антибиотиков [Li Q. et al., 2018], не оказывал какого-либо действия на использованные в работе штаммы грамотрицательных бактерий. В то же время, при совместном действии варнерина (0,128 мг/мл) и полимиксина В чувствительность *E.coli* ATCC 25922 к антибиотикам возрастала в 2 раза, а при действии совместно с полимиксином М увеличивалась в 4 раза. При одновременной атаке бактерий клинических штаммов *E.coli* антибиотиком и варнерином МПК полимиксина В снижались с 1,25 мкг/мл до 0,04 – 0,08 мкг/мл, а для ранее нечувствительных к этому антибиотику штаммов составляли 0,156 – 0,625 мкг/мл. При совместном действии полимиксина М и варнерина МПК для трех клинических и коллекционного штаммов снижались в 4 раза – с 2,5 до 0,625 мкг/мл, один штамм приобретал чувствительность к этому антибиотику (МПК 0,625 мкг/мл), а один штамм сохранял к нему полную толерантность. Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективах значительного повышения бактериолитических эффектов полимиксинов на грамотрицательные бактерии при их совместном действии с низкомолекулярным катионным пептидом семейства антибиотиков варнерином, которое, по-видимому, обусловлено значительным облегчением преодоления пептидом нарушенных полимиксинами поверхностных мембран этих бактерий и проявлением своих мембранолитических свойств лишь при достижении внутренних мембран атакованных бактериальных клеток. Работа выполнена в рамках Государственного задания, номер госрегистрации темы 0120353249 и поддержана Комплексной программой Уральского отделения РАН, Проект № 18-7-8-8.

Литература

- Field D., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Bioengineering antibiotics for therapeutic success // *Frontiers in microbiology*. 2015. V. 6. P. 1 – 8.
- Коробов В. П., Лемкина Л.М., Акименко В.К. Штамм *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 – продуцент низкомолекулярного пептидного соединения, ингибирующего рост клеток грампозитивных бактерий. Патент Российской Федерации на изобретение №2200195, 2003 г.
- Li Q, Montalban-Lopez M, Kuipers OP. Increasing the Antimicrobial Activity of Nisin-Based Antibiotics against Gram-Negative Pathogens // *Applied and Environmental Microbiology*. 2018. Vol. 84, N12. – e00052-18.

ОТКЛИК ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ НА ДЕЙСТВИЕ СВЕРХВЫСОКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗНОГО УРОВНЯ МОЩНОСТИ

О. В. Крюкова¹, В. Ф. Пьянков^{1,2}, Т. В. Рожко³

¹ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, e-mail: kryukova.ov@ksc.krasn.ru

²Сибирский федеральный университет, г. Красноярск,
e-mail: pyankov.vf@ksc.krasn.ru

³Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск,
e-mail: gutniktv72@mail.ru

Окружающая среда современных городов становится все более агрессивной, значительный вклад в это вносит радиочастотное излучение от мобильных коммуникационных устройств и передающих радиотехнических объектов [Belpromme, 2018]. Хотя прямой вред здоровью населения от низкоинтенсивного радиочастотного излучения все еще не доказан, эффект для одноклеточных организмов довольно очевидно показан в ряде работ, авторы которых связывают влияние СВЧ-излучения с широким спектром ответных реакций, варьирующих от изменения скорости роста бактерий до изменения устойчивости к антибиотикам [Salmen, 2016; Tadevosyan, 2008]. Микроорганизмы являются простейшими и одновременно важнейшими компонентами биосферы, и их состояние может служить индикатором состояния экосистемы в целом. Исследование влияния низкоинтенсивных факторов окружающей среды на клеточном уровне возможно с использованием таких тестовых систем как люминесцентные бактерии, которые уже более 40 лет используются в качестве биотестов для мониторинга токсичности различных сред и механизмов их взаимодействия с факторами окружающей среды. Биолюминесцентные биотесты характеризуются высокой скоростью анализа (1–5 мин), чувствительностью и возможностью приборной регистрации параметра физиологической активности – интенсивности свечения [Rozhko, 2017].

В работе использовали интактные светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* 1883 IBSO из коллекции Института биофизики СО РАН (Красноярск); препарат Микробиотест 677F, изготовленный на основе лиофилизированных светящихся бактерий *P. phosphoreum* 1883 IBSO. Использован также Комплект реактивов аналитической биолюминесценции, включающий лиофилизированные препараты люциферазы *Photobacterium leiognathi* (0,5 мг/мл) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* (0,15 ед. активности).

Отклик тест-бактерий на воздействие электромагнитного излучения проводили на установке для исследования влияния СВЧ-излучения на биологические объекты [Копылов, 2014]. Параметры установки при которых проводили воздействие: частота – 915 МГц, плотность потока мощности – 5, 50, 150, 250 мкВт/см². Интенсивность свечения оценивали через 30, 60, 90 и 180 мин воздействия СВЧ-излучения.

Результаты работы представлены на графике в виде относительной интенсивности свечения.

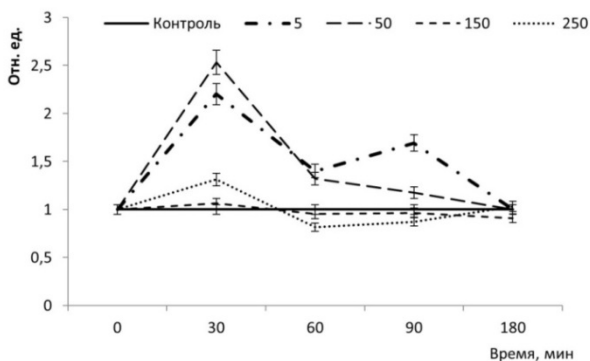


Рис. Изменение относительной интенсивности свечения *Ph. Phosphoreum* в зависимости от мощности СВЧ-излучения (5, 50, 150, 250 мкВт/см²)

Как видно из рисунка при воздействии СВЧ-излучения наблюдается нелинейность отклика на воздействие: увеличение интенсивности свечения люминесцентных бактерий наблюдается через 30 мин. При дальнейшем падении до уровня контроля. Следует отметить, что активация свечения в 2–2,5 раза наблюдается при уровнях мощности 5 и 50 мкВт/см² близких к предельно допустимому – 10 мкВт/см².

Таким образом, *Ph. Phosphoreum* чувствительны к действию низкоинтенсивного электромагнитного излучения СВЧ-диапазона. Для оценки взаимосвязей уровня интенсивности свечения с рисками возникновения патологических состояний у млекопитающих, а также использования *Ph. Phosphoreum* в качестве тест-объектов для определения электромагнитного загрязнения городов необходимо продолжение исследования

Литература

Belpomme D., Hardell L., Belyaev I., Burgio E., O. Carpenter D. Thermal and non-thermal health effects of low intensity non-ionizing radiation: An international perspective // Environmental Pollution. 2018. Vol. 242, Part A. P. 643–658

Salmen S. H. Non-Thermal Biological Effects of Electromagnetic Field on Bacteria // American Journal of Research Communication. 2016. Vol. 4(6). P. 16–28

Tadevosyan H., Kalantaryan V., Trchounian A. Extremely high frequency electromagnetic radiation enforces bacterial effects of inhibitors and antibiotics // Cell Biochem Biophys. 2008. Vol. 51. P. 97–103

Rozhko T. V., Guseynov O. A., Guseynova V. E., Bondar A. A., Devyatlovskaya A. N., Kudryasheva N. S. Is bacterial luminescence response to low-dose radiation associated with mutagenicity? // Journal of Environmental Radioactivity. 2017. Vol. 171. P. 261–265.

Копылов А. Ф., Круглик О. В., Хлебопрос Р. Г. СВЧ установка для исследования биологических эффектов у мышей // Южно-Сибирский научный вестник. 2014. № 1(5). С. 28–29.

ВЛИЯНИЕ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА РОСТ КОЛОНИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Н. В. Латышев¹, О. В. Крюкова², В. Ф. Пьянков^{1,2}

¹ Сибирский федеральный университет,
г. Красноярск, e-mail: latnick@mail.ru

² ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск,
e-mail: kryukova.ov@ksc.krasn.ru

Проблема изучения влияния радиоволн сверхвысокочастотного диапазона (СВЧ) на биологические объекты, остается актуальной не один десяток лет. Это связано с увеличением количества источников излучения СВЧ низкой интенсивности. Особое внимание стоит уделить СВЧ-излучению от сотовой связи, частотный диапазон которого может варьироваться от 900 МГц до 1800 МГц, поскольку такой тип связи является самым распространенным на сегодняшний день. Источники, генерирующие электромагнитное поле, сами по себе являются безопасными, но суперпозиция полей может оказывать значительное влияние на живые организмы. Влияние СВЧ-излучения можно проследить на бактериях, поскольку они имеют простое строение и обладают способностью к быстрому размножению [Малиновская, 2011; Crabtree, 2017; Torgomyan, 2013].

В качестве объекта исследования была выбрана бактерия *E. coli*, так как она часто используется в качестве модельного организма в микробиологических исследованиях, является наиболее изученной, имеет недорогие условия культивирования, а культивируемые штаммы хорошо приспособлены к лабораторным условиям.

Для оценки воздействия электромагнитного излучения сверхвысокой частоты использовали экспериментальную установку (915 МГц, с возможностью выбора мощности воздействия) [Копылов, 2014].

Суспензию бактерий *E. coli* готовили по стандарту мутности производства ГИСК Тарасевича на 5 единиц и делили на 6 частей: 3 контрольных и 3 экспериментальных (по одной на 3 различных мощностях). Экспериментальные пробы находились в установке для воздействия СВЧ-излучения в течение 1 ч (частота: 915 МГц, ППЭ: 15, 150, 1500 мкВт/см²) при температуре 23–24 °С. Контроль находился в тех же условиях, но воздействию СВЧ не подвергался. Посев экспериментальных и контрольных проб проводился одновременно после окончания воздействия, с помощью репликатора, по 25 колоний одного образца на чашку Петри [Руководство..., 1995]. Бактерии выращивали на пептонном агаре при температуре +37 °С. Через неделю после воздействия производился повторный посев бактерий. До повторного посева бактерии находились в стерильных пробирках при температуре 23–24 °С в микробиологическом боксе, не подвергаясь дополнительным воздействиям.

Полученные в результате работы данные показали, что после посева бактерий, суспензия которых подвергалась воздействию СВЧ мощностью 15 мкВт/см² в течение часа, рост колоний не наблюдался. Это может свидетельствовать о том, что СВЧ-излучение данной частоты и мощности может выступать в качестве лимитирующего фактора для *E. coli*. После воздействия СВЧ-излучения мощности 150 мкВт/см² и 1500 мкВт/см² площадь, занимаемая колониями, оказалась меньше площади колоний в контроле. Более того, СВЧ-излучение интенсивности 150 мкВт/см² оказало большее влияние на бактерии *E. coli* чем СВЧ-излучение интенсивностью в 1500 мкВт/см². Через неделю после повторного посева все эффекты сохраняются.

Общие механизмы ингибирующего действия СВЧ-излучения низкой интенсивности не ясны. Эффекты такого ЭМИ могут быть результатом взаимодействия с белками и другими клеточными компонентами, что приводит к стрессовой активации ряда систем клетки, таких как ионные каналы, изменения транспорта веществ через мембрану, системы репарации ДНК, а также взаимодействия молекул и антибактериальных агентов. Эти процессы в свою очередь влияют на концентрацию внутриклеточных метаболитов и процессы метаболизма, и размножения клеток. Стоит отметить, что в логарифмической фазе размножения бактерии обладают наибольшей физиологической активностью и проявляют высокую чувствитель-

ность к действию внешних факторов, которым и является электромагнитное излучение СВЧ-диапазона. Авторы, ряда работ [Малиновская, 2011; Crabtree, 2017; Torgomyan, 2013] считают, что беспроводные коммуникационные устройства, генерирующие микроволновое излучение низкой интенсивности могут служить физическим фактором для изменения антибактериальной чувствительности микроорганизмов, в том числе и *E. coli*.

Литература

Копылов А. Ф., Круглик О. В., Хлебопрос Р. Г. СВЧ установка для исследования биологических эффектов у мышей // Южно-Сибирский научный вестник. 2014. № 1(5). С. 28–29.

Влияние радиоволн на лизогенные клетки кишечной палочки и бактериофаг λ / С. Л. Малиновская, В. А. Монич, Е. Д. Пятова, С. И. Лютов, В. Ф. Лазукин, Д. С. Малиновский, Ю. А. Сизов // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. 2011. № 2(2). С. 90–93.

Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие/ под ред. Н. С. Егорова. М. : МГУ, 1995. 224с.

Crabtree D. P. E., HerreraB. J, Kang S. The response of human bacteria to static magnetic field and radiofrequency electromagnetic field // J. Microbiology. 2017. Vol. 55, N 10. P. 809–815.

Torgomyan H., Trchounian A. Bactericidal effects of low-intensity extremely high frequency electromagnetic field: an overview with phenomenon, mechanisms, targets and consequences // Critical Reviews in Microbiology. 2013. Vol. 39, N 1. P. 102–111.

ПОИСК НОВЫХ ФИЛУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ СПОСОБНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЯТЬ АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ МЕТАНА В ОСАДКАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ

А. В. Ломакина, Т. В. Погодаева, В. Г. Иванов,
И. А. Хальзов, Д. П. Петрова, С. М. Черницына,
Т. И. Земская

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: lomakina@lin.irk.ru

В последние годы в мировой литературе уделяется большое внимание процессам анаэробного окисления метана (АОМ) и микроорганизмам, осуществляющим данный процесс. Ежегодно фиксируется увеличение концентраций атмосферного метана. По данным на 2011 г. в атмосферу из природных источников, включая болота, пресные водоемы поступает 36 % метана, 64 % – имеет антропогенное происхождение. Образовавшийся метан окисляется аэробными и анаэробными метанотрофными микроорганизмами, которые служат природным биофильтром на пути метана в атмосферу и значительно

снижают эмиссию этого парникового газа из различных источников [Каллистова и др., 2017].

На озере Байкал открыто более 54 различных геологических структур, где обнаружены газовые гидраты, из них 18 метановых сипов и 26 грязевых вулканов, различающихся по составу разгружающегося флюида [Khlystov et al., 2019]. В осадках этих районов скорости окисления метана достигают $60 \text{ мкмоль/дм}^3 \text{ сут.}$, максимальные значения которых зафиксированы в поверхностных слоях и вероятно ассоциированы с жизнедеятельностью аэробных метанотрофных бактерий. Тем не менее, и в донных осадках большинства районов фиксируется возрастание интенсивности окисления метана, что может свидетельствовать о функционировании анаэробного сообщества микроорганизмов.

О существовании процессов АОМ известно достаточно давно. В морских экосистемах АОМ осуществляют археи кластеров ANME, используя в качестве акцепторов электронов сульфат-ионы. В большинстве районов разгрузки углеводородов на озере Байкал концентрации сульфат-ионов недостаточны для протекания геохимически значимого сульфатзависимого АОМ. Однако, в высоко минерализованных осадках оз. Байкал в зонах с повышенными концентрациями сульфат-ионов (до 3781 ммоль/дм^3) и при зафиксированных процессах АОМ типичные морские кластеры ANME выявлены не были [Lomakina et al., 2018]. В последние годы ведется активный поиск микробных агентов, осуществляющих АОМ в пресноводных экосистемах. Недавние исследования показали, что в бескислородных слоях почв и донных осадках, метан потребляется анаэробным метанотрофными бактерии и/или археями, которые используют в качестве акцептора электронов нитрит- или нитрат-ионы. Микроорганизмы, осуществляющие АОМ за счет нитрита, были впоследствии классифицированы как бактерии, относящиеся к кандидатному филуму NC10 и названные *Ca. "Methyloirabilis oxyfera"*. АОМ с использованием нитрат-иона в качестве терминального акцептора электронов осуществляют представители подкластера ANME-2d, названные *Ca. "Methanoperedens nitroreducens"*. Возможно, что данный процесс в осадках пресноводного озера могут обеспечивать представители архей ANME-2d и бактерий NC10.

Целью данной работы было детектировать в различных типах геологических структур (метановый сип и грязевой вулкан) на озере Байкал представителей архей кластера ANME-2d, бактерий NC10 и установить в их геномах наличие функциональных генов АОМ, используя методы высокопроизводительного массового секвенирования и ПЦР анализа.

Исследованные районы по химическому составу поровых вод отличаются: в осадках района грязевого вулкана Маленький зафиксированы повышенные концентрации сульфат-ионов (до 3781 ммоль/дм³) и ионов железа (до 19 ммоль/дм³). В районе метанового сипа Посольская банка концентрации ионов железа (до 134 ммоль/дм³), аммония (до 205 ммоль/дм³), ацетата (до 380 ммоль/дм³) были выше фоновых значений.

Исследования, проведенные с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, подтвердили присутствие в исследованных микробных сообществах представителей подкластера ANME-2d. В исследованных осадках их вклад составил от 1 до 22,5 % от общего количества нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК архей. На филогенетическом дереве байкальские последовательности ANME-2d формировали 6 кластеров с ближайшими гомологами, выделенными из богатых железом микробных матов, осадков пресноводного озера, где показано их участие в процессе АОМ за счет денитрификации.

Поиск в исследованных микробных сообществах генов *mcrA* подкластера ANME-2d показал, что сходные нуклеотидные и транслированные аминокислотные последовательности этого гена были обнаружены ранее при анализе библиотек клонов биореактора, рисовых почв, где они участвуют в АОМ при участии нитрат-ионов в качестве акцепторов электронов.

Известно, что представители архей ANME-2d и бактерий филума NC10 могут одновременно присутствовать в микробных сообществах, осуществляя процессы АОМ. Поскольку с помощью высокопроизводительного секвенирования в осадках двух исследованных районов не удалось детектировать представителей кандидатного филума бактерий NC10, был проведен дополнительный анализ со специфичными праймерами для этого таксона. Проведенный анализ подтвердил присутствие в исследованных осадках разнообразных представителей NC10, которые имели наибольший процент сходства (98–99 %) с нуклеотидными последовательностями из осадков озер Бива, Констанс, Рилфут и почв рисовых полей, а также накопительных культур, осуществляя АОМ за счет нитрит-иона.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00244_а и темы гос. задания № 0345-2019-0007.

Литература

Каллистова А. Ю., Меркель А. Ю., Тарновецкий И. Ю., Пименов Н. В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86, № 6. С. 661–683.

Khlystov O. M., Poort J., Mazzini A., Akhmanov G. G., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A. V., Kazakov A. V., De Batist M., Naudts L., Chensky A. G., Vorobeva S. S. Shallow-rooted mud volcanism in Lake Baikal // Marine and Petroleum Geology. 2019. Vol. 102. P. 580–589.

Lomakina A. V., Mamaeva E. V., Galachyants Y. P., Petrova D. P., Pogodaeva T. V., Shubenkova O. V., Khabuev A. V., Morozov I. V., Zemskaya T. I. Diversity of archaea in bottom sediments of the discharge area // Geomicrobiology Journal. 2018. Vol. 35. P. 50–63.

**ИЗУЧЕНИЕ УЧАСТИЯ ПРОТОКАТЕХОАТ ОКСИГЕНАЗЫ
В ДЕГРАДАЦИИ N-ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА
И НАРИНГЕНИНА У *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV.
VICEAE, *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI*,
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM И
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SSP. *SEPEDONICUS***

Л. Е. Макарова, А. С. Мориц

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

Свойство деградировать ароматические соединения различной сложности у бактериальных микроорганизмов было установлено более 50 лет тому назад. Оказалось, что многие виды бактерий способны полностью расщеплять ароматические структуры до ациклических кислот, используемых далее в общих метаболических процессах. В то же время, было установлено, что у одних представителей бактериальной микрофлоры ферментные системы, необходимые для деградации ароматических соединений, индуцируются с их появлением в среде, а у других указанные ферменты синтезируются конститутивно [Parke, Ornston, 1986]. У бактерий существует несколько путей деградации ароматических соединений, которые в немалой степени определяются сложностью их структуры. Деградация полициклических соединений (ПАУ) в основном осуществляется по двум путям: по пути образования катехола и по фталатному пути [Seo et al., 2009]. Фталатный путь при этом может завершаться расщеплением протокатеховой кислоты до β-карбокси – цис-цис-муконата при участии фермента протокатехоат оксигеназы (EC 1.13.11.3) [Liang et al., 2008]. При деградации флавоноидов, по-видимому, также могут быть задействованы разные пути расщепления для колец А и В [Rao, Cooper, 1994]. При распаде кольца В на последнем этапе его расщепления может участвовать протокатехоат оксигеназа [Parke, Ornston, 1986].

В своих экспериментах мы установили, что один из представителей полициклических соединений, обнаруженный нами в корнях и корневых экссудатах бобовых культур – N-фенил-2-нафтиламин, бактериями может подвергаться деградации с образованием фталатов, основных конечных продуктов распада указанного соединения. В экстрактах из культуральных сред и из бактериальных клеток мы не обнаружили протокатеховой кислоты и диоксифталатов, предшествующих ей по фталатному пути деградации ПАУ [Liang et al., 2008; Seo et al., 2009]. Тем не менее, у представителей родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Pseudomonas* возможности для расщепления протокатеховой кислоты по β -кетoadипатному пути с участием протокатехоат оксигеназы неоднократно отмечали [Keyser et al., 1976; Parke, Ornston, 1986] и, в частности, при деградации флавоноидов [Parke, Ornston, 1986].

Для выяснения причины отсутствия протокатеховой кислоты и диоксифталатов в экстрактах из культуральных сред и из бактерий, росших в присутствии N-фенил-2-нафтиламина, в представляемой работе стояла цель – сравнить у четырех изучаемых нами видов бактерий возможности для деградации протокатеховой кислоты по β -кетoadипатному пути с участием фермента протокатехоат оксигеназы. При этом сравнивали с видом бактерий (*Bradyrhizobium japonicum*), у которых установлен конститутивный синтез изучаемого фермента [Parke, Ornston, 1986].

Объектом исследований служили бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм RCAM 1022), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845), *Bradyrhizobium japonicum* (штамм 626) и *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (штамм 6889), росшие в течение 2-х сут в минимальной жидкой среде в присутствии 100 мкМ N-фенил-2-нафтиламина, или в присутствии 10 мкМ нарингенина, как единственного источника углеводов. Контролем служили бактерии, росшие на среде с 0,1 % глюкозы. Получение ферментных препаратов и определение активности фермента проводили в соответствии с рекомендациями из работ [Fujisawa, Hayaishi, 1968; Durham et al., 1980] с некоторыми нашими изменениями.

По данным таблицы, активность протокатехоат оксигеназы в клетках контроля у бактерий *Bradyrhizobium* и *Cms* свидетельствуют о наличии у этих видов бактерий конститутивного синтеза данного фермента. В клетках бактерий *Rhizobium* и *Pseudomonas* синтез данного фермента не установлен в контроле, но индуцируется в присутствии нарингенина. Активность исследуемой диоксигеназы у *Brady-*

rhizobium и *Cms* при их росте на N-ФНА также обнаруживалась, а у бактерий *Rhizobium* и *Pseudomonas*, по всей вероятности, синтез данного фермента полностью отсутствовал. Полученные нами результаты позволяют высказать предположение о том, что N-фенил-2-нафтиламин полностью блокирует синтез фермента протокатехоат оксигеназы у бактерий *Rhizobium* и *Pseudomonas*.

Таблица

Активность протокатехоат оксигеназы в клетках бактерий, в зависимости от присутствия в культуральной среде ароматических соединений

Вариант	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	<i>Cms</i>
Контроль	-	+	-	+
Рост на 100 мкМ N-ФНА	-	+	-	+
Рост на 10 мкМ нарингенина	+	+	+	+

«+» или «-» – соответственно, наличие или отсутствие активности фермента

Литература

- Durham D. R., Stirling L. A., Ornston L. N., Perry J. J. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii* // Biochemistry. 1980. Vol. 19, N 1. P. 149–155.
- Fujisawa H., Hayaishi O. Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization // J. Biol. Chem. 1968. Vol. 243, N 10. P. 2673–2681.
- Keyser P., Pujar B. G., Eaton R. W., Ribbons D. W. Biodegradation of the Phthalates and Their Esters by Bacteria // Environmental Health Perspectives. 1976. Vol. 18. P. 159–166.
- Liang D. -W., Zhang T., Fang H. H. P., He J. Phthalates biodegradation in the environment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80, N 2. P. 183–198.
- Parke D., Ornston L. N. Enzymes of the β -Ketoacid Pathway Are Inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. And Constitutive in *Bradyrhizobium* spp. // J. Bacteriol. -1986. Vol. 165, № 1. P. 288–292.
- Rao J. R., Cooper J. E. Rhizobia Catabolize nod Gene-Inducing Flavonoids via C-Ring Fission Mechanisms // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176, N 17. P. 5409–5413.
- Seo J. S., Keum Y. -S., Li Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2009. Vol. 6. P. 278–309.

БИОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *RHIZOBIACEAE*

А. Ю. Муратова, С. Н. Голубев,
И. Ю. Сунгурцева, О. В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, г. Саратов,
e-mail: ayumuratova@yandex.ru

Необходимость восстановления земель, нарушенных в результате загрязнения многочисленными поллютантами, среди которых такие опасные как пестициды, тяжелые металлы, нефтяные углеводороды, продолжает оставаться актуальной. Для решения проблемы применяются как физико-химические, так и биологические методы реабилитации, при этом последним отдается предпочтение. Использование биоремедиационного потенциала растений и ассоциированных с ними микроорганизмов для очистки окружающей среды от органических и неорганических загрязнителей в последние десятилетия оформилось в современную и все более широко применяемую технологию – фиторемедиацию. Являясь экологически чистой и экономически выгодной, эта биотехнология обеспечивает сразу несколько положительных эффектов, связанных с улучшением качества почвы – очистку от загрязнителей, обогащение доступным углеродом и/или другими макро- и микроэлементами, производство биомассы (например, для получения биотоплива), а также поддержание биоразнообразия почвенных микроорганизмов под влиянием растений. Представители семейства Leguminosae (Бобовые) признаны эффективными фиторемедиантами, используемыми для очистки почв от органических и неорганических загрязнителей. Ассоциации бобовых растений с их азотфиксирующими микробными симбионтами – ризобиями – в последние годы привлекает все большее внимание исследователей, занимающихся восстановлением нарушенных земель и фиторемедиацией [Checcucci et al., 2017].

Ризобии широко распространены в почвенных и корневых экосистемах, могут увеличивать рост и продуктивность растений (главным образом, бобовых), обеспечивая их доступным минеральным азотом, что приводит к снижению потребности в удобрениях. В настоящее время к ризобиям относят все ризобактерии, которые образуют эндосимбиотические азотфиксирующие ассоциации с растениями. Согласно современной таксономии, большинство ризобий принадлежит к классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Rhizobiales*,

включающему несколько семейств, среди которых *Rhizobiaceae* – первое описанное и наиболее многочисленное, представители его широко используются в качестве моделей в научных исследованиях и как биопрепараты для повышения урожайности сельскохозяйственных растений.

В последние два десятилетия интенсифицировались исследования, направленные на изучение биоремедиационного потенциала ризобий. Эволюционно сложившиеся тесные физиолого-биохимические взаимодействия этих бактерий с растениями обуславливают их специфические способности, связанные с азотфиксацией и деградацией широкого спектра органических соединений, что, очевидно, имеет большое значение для биоремедиации. К настоящему времени есть сведения об утилизации ризобиями таких поллютантов как фенольные соединения, алифатические и ароматические углеводороды, включая полициклические углеводороды (ПАУ), хлорированные соединения и пестициды. Вместе с тем, бактериальные катаболические пути и ферменты, участвующие в деградации этих соединений, изучены недостаточно. Кроме органических соединений есть данные, что ризобии могут быть мощным инструментом в биоремедиации почв от тяжелых металлов.

На базе коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН проводятся исследования по выделению и изучению биоремедиационного потенциала ассоциативных и симбиотических микроорганизмов в отношении нефтяных углеводородов, пестицидов и тяжелых металлов. Так, с использованием методов хроматографии и масс-спектрометрии были впервые описаны пути метаболизма ПАУ для представителей семейства *Rhizobiaceae* – *Rhizobium petrolearium* и *Ensifer meliloti* [Muratova et al., 2015]. Для штаммов *R. petrolearium* Rsf 11 (IBPPM 350) и *R. petrolearium* P2 (IBPPM 353) определены ключевые метаболиты, образующиеся при биodeградации ими фенантрена. Исследование биотрансформации ПАУ штаммом *E. meliloti* P221 (IBPPM 383) позволило определить спектр деградируемых им соединений, ферменты деградации, и установить, что биоконверсия фенантрена осуществляется двумя параллельными путями, что указывает на широкие адаптивные возможности этого микроорганизма в условиях загрязнения ПАУ. В лабораторных вегетационных опытах было изучено влияние инокуляции ризобактерией *E. meliloti* P221 на биохимические и физиологические характеристики сорго веничного и люцерны посевной, показана стимуляция роста бактеризованных растений в условиях загрязнения грунта фенантре-

ном. Микробный инокулянт приживался и селективно поддерживался в ризосфере сорго, что послужило основанием для разработки искусственной ассоциации сорго веничное – *E. meliloti* P221 и способа ее использования в очистке ПАУ-загрязненного грунта.

Особое внимание заслуживают штаммы ризобий, демонстрирующие высокую устойчивость к различным стресс-факторам – засоленности, присутствию тяжелых металлов, изменению pH. Интересно, что гены устойчивости к тяжелым металлам широко распространены среды представителей *Rhizobiaceae* [Checcucci et al., 2017]. Устойчивость к никелю и кадмию была выявлена у коллекционных штаммов *R. petrolearium* и *E. meliloti*. Исследование влияние кадмия на биodeградацию фенантрена штаммом *E. meliloti* P221 показало, что в концентрации до 2 ммоль/л металл не оказывал существенного влияния на катаболизм этого ПАУ. Полученные данные предполагают перспективность использования указанного штамма для ремедиации смешанных загрязнений, содержащих ПАУ и тяжелые металлы.

С использованием молекулярно-генетических методов у коллекционных ризобий был выявлен ген *phnJ*, кодирующий компонент мультиферментного C–P-лиазного комплекса, непосредственно участвующий в расщеплении крайне устойчивой C–P связи фосфонатов. Способность к использованию пестицида глифосата в качестве единственного источника азота ризобиями была подтверждена экспериментально.

Таким образом, результаты собственных исследований и анализ опубликованных данных, свидетельствуют о природном сочетании у ризобий широких катаболических возможностей, которые могут быть успешно использованы для решения задач био- и фиторемедиации почв от органических и неорганических загрязнителей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-29-05062).

Литература

Checcucci A., Bazzicalupo M., Mengoni A. Exploiting nitrogen-fixing rhizobial symbionts genetic resources for improving phytoremediation of contaminated soils // Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants / N. A. Anjum, S. S. Gill, N. Tuteja (eds.). Springer International Publishing AG, 2017. P. 275–288.

Muratova A., Dubrovskaya E., Golubev S., Grinev V., Chernyshova M., Turkovskaya O. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa* // Journal of Plant Physiology. 2015. Vol. 188. P. 1–8.

ВЫЖИВАЕМОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ

М. П. Неустроев^{1,2}, Н. П. Тарабукина¹

¹ ФИЦ ЯНЦ Якутский НИИ сельского хозяйства, г. Якутск,
e-mail: hotubact@mail.ru

² ФГБОУ ВО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия»

Общепризнанное потепление климата в Арктике может увеличить риск возникновения и распространения инфекционных болезней человека и животных из-за таяния вечной мерзлоты, интенсивного освоения природных ресурсов, контролируемых и неконтролируемых палеонтологических раскопок, расширения среды обитания переносчиков (насекомых, грызунов), изменения путей миграции перелетных птиц.

Для санитарно-бактериологической оценки объектов внешней среды, а также определения возможного срока контаминации их патогенной и условно-патогенной микрофлорой в случае выделения их больными животными или бактерионосителями, очень важно знание сроков выживаемости микроорганизмов во внешней среде.

Проведенные в ЯНИИСХ исследования показали, что сроки выживаемости некоторых микроорганизмов на объектах внешней среды в условиях вечной мерзлоты в 2–3 раза превышают сроки выживаемости аналогичных микроорганизмов в южных и европейских территориях России и за рубежом. По результатам наших исследований, в животноводческих помещениях кишечная палочка и золотистый стафилококк выживают 90–180 дней, а возбудитель трихофитии сохраняет жизнеспособность и патогенность более 2 лет (срок наблюдения). В навозе кишечная палочка, мытный стрептококк, золотистый стафилококк выживают от 1,5 до 2 лет, а микобактерии туберкулеза до 4 лет. В поверхностных слоях мерзлотных почв кокковые формы бактерий (в летний период) выживают до нескольких месяцев, возбудители сальмонеллез сохраняют жизнеспособность и патогенность более 1 года, а возбудители туберкулеза, в зависимости от вида микобактерий и глубины залегания, выживают от 1 до 3 лет. Таким образом, вечная мерзлота способствует длительному сохранению очагов и факторов передачи инфекций.

При изучении микробной контаминации, сроков выживаемости микроорганизмов учеными ЯНИИСХ установлено значительное содержание аэробных спорообразующих бактерий (более 2×10^6 КОЕ/г) в мерзлотных почвах Центральной Якутии. Благодаря способности

образовывать споры и высоким адаптивным возможностям аэробные спорообразующие бактерии широко распространены в природной среде Якутии и, по-видимому, играют большую роль в различных биологических процессах. Нами изучены биологические свойства споровых бактерий, выделенных из мерзлотных почв, и установлена их высокая антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов для человека, животных и растений. Из них два штамма, обладающие наиболее выраженными антагонистическими свойствами, паспортизированы и депонированы в коллекции микроорганизмов Всероссийского ГНКИ стандартизации, контроля и сертификации.

В связи увеличением температуры поверхностного слоя вечной мерзлоты на 2–4 °С (в 1900–1980 гг.) и ожидаемым дальнейшим повышением на 3 °С обоснуется проведения мониторинга условий вечной мерзлоты во всех неблагополучных пунктах по сибирской язве [Revich, Podolnaya, 2011]. Известно, что глобальное потепление способствует вирусам преодолеть межвидовой барьер и распространению их с теплых стран в другие территории [Legendre et al., 2014]. Интересен факт возрождения гигантского вируса из льда с возрастом 30 тысяч лет. Выделение якутскими учеными жизнеспособных бактерий рода *Bacillus* из представителей мамонтовой фауны, сохранившихся в многолетних мерзлых грунтах (возраст 30–40 тысяч лет) доказывает роль вечной мерзлоты в сохранении бактерий плейстоценового периода [Tarabukina et al., 2010; Neustroev, 2012].

В России последняя вспышка сибирской язвы отмечена в Ямале 2016 г., причиной возникновения считается оттаивание вечной мерзлоты. До этого вспышка сибирской язвы в Ямале зарегистрирована 1941 г. Исходя из этого, можно предположить, что споры оставались жизнеспособными в мерзлотной почве не менее 75 лет. Возникновению инфекционной болезни в Ямале в 2016 г. способствовала отмена вакцинации оленей в 2007 г. в виду признания в 1968 г. этой территории свободной от сибирской язвы [Timofeev et. al, 2018].

В Якутии сибирская язва с 1993 г. не регистрируются. Однако в 2015 г. выделены 3 штамма возбудителя сибирской язвы в результате палеонтологических раскопок в Абыйском районе. По результатам наших исследований в Абыйском районе Якутии нет зафиксированных данных о наличии неблагополучных пунктов, что свидетельствует об еще недостаточном информированности.

Следует отметить отсутствие научных данных о выживаемости возбудителя сибирской язвы в условиях вечной мерзлоты. Возмож-

ность возникновения сибирской язвы диктует необходимость изучения выживаемости спор возбудителя сибирской язвы в условиях вечной мерзлоты и разработки средств и методов обеззараживания.

Таким образом, знание сроков выживаемости микроорганизмов на объектах внешней среды в экстремальных условиях Крайнего Севера, необходимы и способствуют оптимизации противоэпизоотических и эпидемиологических мероприятий в профилактике или ликвидации инфекционных болезней человека и животных.

Литература

Legendre M., Bartoli J., Shmakova L., Jeudy S., Labadie K., Adrat A., Lescot M., Poirot O., Bertaux L., Bruley C., Coute Y., Rivkina E., Abergel C., Claverie J. Thirty–Thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology // Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (March 18, 2014). N 111(11). P. 4274–4279.

Neustroev M. P. On the prospects of microbiological research on mammoth fauna in permafrost // Quaternary International. 2012. Vol. 255. P. 139–140.

Tarabukina N. P., Neustroev M. P., Fedorova M. P., Parnikova S. I., Neustroev M. M. Yakutia Zoolite Microflora // V th International Conference on Mammoth and their Relatives. 2010. P. 59–60.

Revich B. A., Podolnaya M. A. Thawing of permafrost may disturb historic cable burial grounds in East Siberia. Ciba: Global Health Action, 2011, 4: 8482. doi: 10.3402/gha.410.8482

Timofeev V., Bakhteeva I., Mironova R., Tibareva G., Lev I., Christy D., Borzibov A., Bogun A., Vergnaud G. Insights from *Bacillus anthracis* isolation from permafrost in the tundra zone of Russia. BioRxiv preprint first posted online Dec. 3. 2018. doi: 10.1101/486290.

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

А. С. Новикова, Т. А. Ханаева, О. Н. Павлова

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: novikova.angelinkaa@mail.ru

Термофильные прокарриоты – особая группа микроорганизмов, развивающаяся при температурах выше 60 °С. К естественным местам обитания термофильных микроорганизмов, относятся различные геотермальные зоны: горячие источники, глубоководные гидротермы, районы вулканической активности, высокотемпературные месторождения нефти.

За последние годы, ученые все чаще обнаруживают термофильные прокарриоты в психрофильных местах обитания. Одним из таких мест, оказались донные осадки у берегов Северного Ледовитого океана, температура которых не превышает 4 °С. Полученные из осадков

термофильные анаэробные микроорганизмы рода *Desulfotomaculum*, из-за неблагоприятных условий для роста, находились в состоянии анабиоза [Hanson et al., 2019]. Для пресноводных озер, в частности глубоководных осадков оз. Байкал, подобное явление ранее не регистрировалось.

Озеро Байкал, донные осадки которого являются объектом исследования, не относится к термальным местам обитания. Стабильно низкие температуры глубоководных осадков до 6°C определяют развитие и функционирование психрофильного микробного сообщества [Намсараев, Земская, 2000]. Расположение озера Байкал в тектонически активной зоне обуславливает наличие районов геологических аномалий – разгрузок газонасыщенных флюидных потоков, которые мигрируют вдоль проницаемых зон и появляются в поверхностных осадках озера [Naudts et al., 2012]. Вместе с флюидными потоками в холодные донные осадки из глубинной зоны могут поступать представители термофильного микробного сообщества [Павлова и др., 2017]. Одним из районов разгрузки газонасыщенных флюидов в озере Байкал, является подводная возвышенность Посольская Банка. Анализ теплового потока, сейсмические и гидроакустические исследования показали, что в этом районе идет активная миграция газонасыщенных флюидных потоков, часть из которых имеет глубинное термогенное происхождение [Naudts et al., 2012].

Из поверхностных осадков метанового сипа Посольская Банка получены чистые культуры термофильных факультативно-анаэробных микроорганизмов, относящиеся к филуму *Firmicutes*, роду *Geobacillus* и роду *Thermaerobacter* [Ханаева и др., 2017; Павлова и др., 2017; Новикова и др., 2018]. Температурный оптимум роста микроорганизмов составляет 60°C, температурный максимум 80°C. При культивировании в анаэробных условиях наблюдалось образование спор. Штамм *Geobacillus sp.* на филогенетическом дереве образует общую кладу с некультивируемыми формами и не кластеризуется с последовательностями культивируемых штаммов внутри рода *Geobacillus*. Штамм *Thermaerobacter sp.*, в отличие от известных видов этого рода – миксотроф, обладает способностью роста за счет окисления водорода.

Наличие термофильных микроорганизмов в районах разгрузки углеводородов может быть следствием их миграции по зонам разломов на поверхность дна озера вместе с газосодержащим минерализованным флюидом. В отличие от холодных морских осадков, где эндоспоры термофильных бактерий принадлежат строгим анаэро-

бам, обеспечивающим свой метаболизм за счет ферментации органических субстратов или сульфатредукции, в осадках озера Байкал, ассоциированных с выходами газонасыщенных флюидов обнаружены факультативно анаэробные термофильные прокариоты. Однако после попадания в поверхностные слои донных осадков, микроорганизмы образуют эндоспоры, так как температурный оптимум их роста находится значительно выше температур, характерных для поверхностных осадков оз. Байкал.

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме № 0345-2019-0007 и гранта РФФИ № 18-34-00435 мол_а.

Литература

Намсараев Б. Б., Земская Т. И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск : СО РАН, 2000. 160 с.

Новикова А. С., Павлова О. Н., Земская Т. И. Термофильные бактерии рода *Thermaerobacter* в газонасыщенных осадках метанового сипа озера Байкал // Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященная 100-летию ФГБОУ ВО ИГУ. Иркутск : ИГУ, 2018. С. 83–85.

Павлова О. Н., Букин С. В., Горшков А. Г. и др. Микроорганизмы озера Байкал: от психрофильных углеводородокисляющих аэробов до термофильных миксотрофов // I Российский микробиологический конгресс. Пушино : ИД «Вода: химия и экология», 2017. 68–69 с.

Ханаева Т. А., Павлова О. Н., Черницына С. М. и др. Термофильная факультативно анаэробная бактерия р. *Geobacillus* из донных осадков озера Байкал // Acta Biologica Sibirica. 2017. Т. 3, № 3. С. 39–46.

Hanson C., Mueller A., Loy A et al., Historical Factors Associated With Past Environments Influence the Biogeography of Thermophilic Endospores in Arctic Marine Sediments // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10, Is. 245.

Naudts L., Khlystov O. et al., Stratigraphic and structural control on the distribution of gas hydrates and active gas seeps on the Posolsky Bank, Lake Baikal // Geo-Marine Letters. 2012. Vol. 32, Is. 5. p. 395 – 406.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ Ag НА РОСТ КОЛОНИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

А. П. Ованесян^{1,2}, С. В. Столяр^{1,2}, Л. С. Тирранен^{2,3}

¹ СФУ, г. Красноярск, albinaovanesyan@gmail.com;

² ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск;

³ ФИЦ ИБФ СО РАН, г. Красноярск, tiran@ibp.ru

Всемирная организация здравоохранения 29 января 2018 г. заявляет о бактериях, устойчивых к воздействию антимикробных препаратов [3]. Появление микробной резистентности ко многим препаратам привело к разработке новых антимикробных агентов, среди которых рассматриваются и наноразмерные материалы [1].

Цель исследования – выявить и оценить действия 1 % и 0,25 % концентраций, доз суспензии (0,1 мл; 0,05 мл; 0,02 мл; 0,01 мл), длительности воздействия (до 66 ч) магнитных наночастиц серебра размером 50 нм на рост колоний *Pseudomonas aeruginosa*.

Объектами исследований были магнитные наночастицы FeP@Ag и тест-бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*), росшие на рыбопептонном агаре (РПА).

Образец порошков был получен методом химического осаждения. Порошки ресуспендировались в стерильной колбе со 100 мл отстоянной водопроводной воды, в течение 4 мин обрабатывались аппаратом «Волна» (аппарат ультразвуковой технологический УЗТА-04/22-ОМ производства «Центр ультразвуковых технологий – www.u-Sonic.ru). Затем колбу с водной взвесью стерилизовали при 1 атм.

На поверхность предварительно разлитой в стерильные чашки Петри агаризованной питательной среды РПА наносили 1 % и 0,25 % концентрации, дозы суспензии (0,1 мл; 0,05 мл; 0,02 мл; 0,01 мл) полученной водной взвеси магнитных наночастиц и растирали стерильным шпателем. Порошок Ag получен из раствора состава: нитрат серебра, гипофосфит натрия, гидроксид натрия.

Из суточных тест-бактерий *Pseudomonas aeruginosa* по оптическому стандарту мутности на 5 единиц (НИИ им. Л. А. Тарасевича) готовили суспензию, которой пастеровскими пипетками заполняли лунки станины репликатора. С помощью ручки репликатора делали реплики до 25 тест-бактерий одновременно на поверхность агаризованной питательной среды РПА с исследуемыми наночастицами в чашках Петри. Чашки с засеянными тест-бактериями инкубировали в термостате при 37 °С и до 66 ч времени воздействия.

Реакции колоний *Pseudomonas aeruginosa* на действие наночастиц оценивали в течение 30 (или 66) часов совместного роста по разнице в размерах колоний *Pseudomonas aeruginosa* в опыте и контроле [4]. Учитывали среднюю арифметическую величину колоний исследуемых бактерий, ошибку средней арифметической. Критерием оценки достоверности отличий служила стандартная величина нормированного отклонения (t_{st}) для 95–99,9 % -го уровня значимости [2].

Воздействие испытуемых магнитных композиционных наночастиц FeP@Ag на колонии *Pseudomonas aeruginosa* оценивали как стимулирующее или ингибирующее, когда размер колоний тест-бактерий в опыте был достоверно увеличен или снижен по сравнению с контролем.

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 и 2 представлены результаты опыта по влиянию 0,25 % и 1 % концентраций и доз суспензии магнитных наночастиц (0,1 мл) FeP@Ag, на рост колоний *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 25$) через 30 ч инкубирования в термостате при 37 °C.

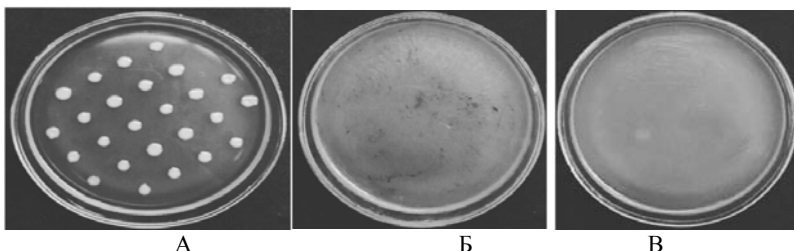


Рис. 1. Колонии *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 25$) после 30 ч культивирования в термостате в чашках Петри при 37 °C на РПА.

А – контроль; Б – бактерицидное действие на рост колоний *Pseudomonas aeruginosa* при 0,25 % концентрации наночастиц серебра, дозе 0,1 мл, при 30 ч воздействия; В – бактерицидное действие на рост колоний *Pseudomonas aeruginosa* при 1 % концентрации наночастиц серебра, дозе 0,1 мл, при 30 ч воздействия

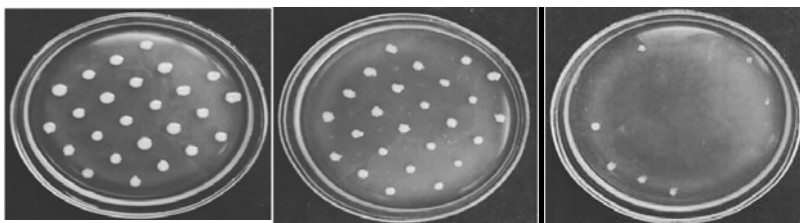


Рис. 2. Колонии *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 25$) после 30 ч культивирования в термостате в чашках Петри при 37 °C на РПА.

А – контроль; Б – бактериостатическое действие при 0,25 % концентрации наночастиц серебра и дозе 0,02 мл, времени воздействия – 30 ч; В – бактериостатическое действие на рост колоний *Pseudomonas aeruginosa* при 1 % концентрации наночастиц серебра, дозе 0,02 мл, времени воздействия – 30 ч)

Таким образом, магнитные наночастицы серебра FeP@Ag оказывают влияние на рост колоний *Pseudomonas aeruginosa* в зависимости от концентраций, доз и длительности воздействия.

Литература

Некоторые экспериментальные и клинические результаты применения катионов серебра в борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами / В. Н. Иванов, Г. М. Ларионов, Н. И. Кулиш и др. // Серебро в медицине, биологии и технике. Сиб. отд. РАМН. 1995. № 4. С. 53–62.

Лакин Г. Ф. Биометрия. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.
Устинов А. В. Новый доклад ВОЗ по антибиотикорезистентности.
<https://www.umj.com.ua/article/120095/novyy-doklad-voz-po-antibiotiko-rezistentnosti>
Патент № RU 2410437 Тирранен Л. С., Торотенкова В. Н., Сказка Т. Б. Способ определения бактериостатического, бактерицидного и стимулирующего действия антибиотика на микроорганизмы, Бюл. № 3. 2011.

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТА СЕЛЕНА И КАРРАГИНАНА НА ВОЗБУДИТЕЛЬ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ И КАРТОФЕЛЬ *IN VITRO*

А. И. Перфильева¹, О. А. Ножкина¹, И. А. Граскова^{1,2},
А. В. Дьякова³, Г. П. Александрова⁴, Сухов Б. Г.^{2,4},
Б. А. Трофимов⁴

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: alla.light@mail.ru

²Иркутский научный центр СО РАН, г. Иркутск

³Иркутский государственный университет, г. Иркутск

⁴Иркутский институт химии СО РАН, г. Иркутск

Ранее нами было показано, что наноконпозиты селена и арабиногалактана обладают бактерицидным и бактериостатическим эффектом по отношению к фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) и не оказывают негативного влияния на жизнеспособность растений картофеля *in vitro* [Перфильева и др., 2018]. В настоящей работе изучали биологическую активность наноконпозита селена и каррагинана (НК Se/Kap) – его влияние на бактерию *Cms* и картофель *in vitro*.

Синтез НК Se/Kap. Для создания наноконпозита использовали готовый препарат каррагинана. Синтез наноконпозита осуществляли с использованием ранее разработанной методики формирования наночастиц (НЧ) в полисахаридной матрице арабиногалактана [Карпова и др., 2013]. Для экспериментов использовали растворы наноконпозита, в которых содержание селена составляло 0,000625 %.

Культивирование растений картофеля. Влияние наноконпозита изучали на растениях картофеля *in vitro* сорта Лукьяновский, являющийся восприимчивым к кольцевой гнили картофеля [Romanenko et al., 1999]. Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляли с помощью черенкования на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (4,2 г/л).

Бактерии. Использовали штамм *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) Ac-1405, возбудителя кольцевой гнили картофеля

(получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пушкино, Московская обл.). Бактерии *Cms* выращивали на среде с глюкозой, пептоном и дрожжевым экстрактом (GPY) [Roozen, Van Vuurde, 1991]. Для исследования бактериостатической активности биокомпози́тов селена в отношении кольцевой гнили картофеля жидкую культуру *Cms* выращивали в темноте при 26 °С на качалке (80 об./мин) в колбах, содержащих питательную среду GPY.

Для проведения эксперимента в среду роста картофеля вносили водный раствор нанокомпози́тов. В вариантах с заражением, в среду роста вносили 1 сут. суспензию *Cms*. Растения инкубировали 26 сут, отслеживая каждые 2 сут. биометрические показатели (длину растений и количество листьев, длину междоузлий, массу корней и массу надземной части) и активность гваяколзависимой пероксидазы в листьях (измеряли спустя сутки коинкубации растений с НК Se/Кар) [Бояркин, 1951].

Первоначальной задачей настоящего исследования было выявление влияния исследуемых нанокомпози́тов на *Cms*. Для обнаружения бактериостатического эффекта нанокомпози́тов использовали метод измерения оптической плотности бактериальной суспензии. В контроле наблюдалась типичная логарифмическая кривая роста бактерий. НК Se/Кар ингибировал прирост бактерий с 4 ч наблюдения по 44 ч, далее наблюдалась стимуляция прироста микроорганизмов. Вероятно, после 4 ч инкубации, произошло разложение НК с высвобождением токсичных НЧ селена, которые убивали бактерии в течение 40 ч инкубации. Далее все НЧ были агрегированы мертвыми клетками бактерий, а бактерии, оставшиеся живыми, начали активно размножаться, так как в среде культивирования присутствовали питательные вещества.

Следующим этапом исследования являлось выявление влияния НК Se/Кар на растения, зараженные возбудителем кольцевой гнили картофеля. Нами были исследованы биометрические характеристики растений. НК Se/Кар стимулировали прирост растений в течение всего периода наблюдения. Заражение растений *Cms* после 6 сут. коинкубации снижало прирост растений. Заражение растений *Cms* в совокупности с обработкой НК Se/Кар никак не отличалось от контрольного варианта. Также нами был исследован такой биометрический показатель как количество листьев у растений картофеля, подвергнутых обработке НК Se/Кар. Анализ количества листьев показал, что зараженные растения картофеля характеризовались меньшим количеством листьев по сравнению с контролем. НК Se/Кар

незначительно снижал число листьев у растений. Обработка НК Se/Кар совместно с заражением растений *Cms* стимулировала количество листьев у картофеля по сравнению с контрольными растениями. В конце эксперимента нами была определена биомасса надземной части растений и их корней. Обнаружено, что заражение растений совместно с обработкой их НК Se/Кар значительно снижало массу корней и массу вегетативной части, хотя количество листьев было высоким в настоящем варианте, однако растения не характеризовались хорошим приростом. По активности пероксидазы в тканях листьев картофеля нами не было выявлено каких либо достоверных изменений в активности фермента при всех видах обработки.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МК-1220.2019.11. и грантом РФФИ № 17-416-380001.

Литература

- Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. 1951. Т. 16. С. 352–355.
- Карпова Е. А., Сухов Б. Г., Колесникова Л. И., Власов Б. Я., Ильина О. П., Артемьев А. В., Лесничая М. В., Погодаева Н. Н., Сайванова С. А., Кузнецов С. В., Трофимов Б. А. Антиоксидантное средство с гепатопротекторным эффектом на основе наноструктурированного селена и способы его получения и применения. Патент на изобретение RUS 2557992. 30.12.2013.
- Перфильева А. И., Ножкина О. А., Граскова И. А., Сидоров А. В., Лесничая М. В., Александрова Г. П., Долмаа Г., Клименков И. В., Сухов Б. Г. Синтез нанобиокомпозигов селена и серебра и их влияние на фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Известия Академии наук. Сер. хим. 2018. № 1. С. 157–163. doi: 10.31255/978–5-94797–319–8-626–629.
- Romanenko A. S., Riffel A. A., Graskova I. A., Rachenko M. A. The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring-rot pathogen // J. Phytopathol. 1999. Vol. 147(11–12). P. 679–688.
- Rozen N. J. M., Van Vuurde J. W. L. Development of a semi-selective medium and an immunofluorescence colony-staining procedure for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in cattle manure slurry // Netherlands J. Plant Pathology. 1991. Vol. 97, N 5. P. 321–334.

ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАНИЯ *S. CEREVISIAE* В ПРИСУТСТВИИ ЛАЗЕРНЫХ ЛУЧЕЙ

Е. В. Симонова¹, Л. А. Кокорина^{1,2},
Т. П. Денисова², Е. Н. Максимова²

¹ ФГБОУ ВО ИГМУ Министерства здравоохранения РФ, г. Иркутск,
e-mail: evsimonova@yandex.ru

² ФГБОУ ВО «ИГУ», г. Иркутск, e-mail: bios5646@gmail.com

Биологическое процветание любого вида микроорганизмов обеспечивается их ростом и размножением, которые зависят от пищевых возможностей и определяются их трофическими свойствами. В связи с этим цель данного исследования состояла в изучении изменения показателей роста и развития периодической тест-культуры на питательном субстрате, подвергавшемуся воздействию лазерного излучения.

В экспериментальных исследованиях в качестве тест-культуры использован музейный штамм *S. cerevisiae*, зарегистрированный в музейной коллекции ЦМПМ ВНИИ генетики под номером Y-355. В качестве питательной среды для периодического культивирования использована стандартная жидкая питательная среда Сабуро, которая в отличие от контрольного варианта, в опыте подвергалась воздействию лазерного излучения.

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный диод. Воздействие на питательную среду проводилось в режиме «светового котла» до внесения в нее суспензии микроорганизмов. Мощность излучения составляла около 100 мВт с длиной волны 532 нм и суммарной энергией облучения 5 Дж/г в течение 20 и 60 с.

После воздействия лазера в опытном варианте и контроле в питательную среду вносилась микробная взвесь тест-культуры в равной концентрации. Для определения динамики развития микробной популяции в опытном и контрольном вариантах, начиная с 0 точки, через каждые 24 ч проводили количественный посев на твердую питательную среду Сабуро с целью определения концентрации микроорганизмов в процессе развития периодической культуры. Условия культивирования стандартные и соответствуют росту и развитию дрожжей-сахаромицетов. Экспериментальные исследования проводили в течение 168 ч. На основании полученных результатов были рассчитаны показатели роста и развития периодической культуры, а также определены ее морфотипы.

Характер кривой роста периодической культуры в контроле указывает на ее нормальное физиологическое развитие, однако, полного ингибирования культуры *S. cerevisiae* в течение экспериментального исследования не установлено. После короткого периода адаптации, культура выходит в стадию экспоненциального роста, продолжающегося 48 ч. За этот период концентрация микробных клеток достигает своего максимального значения, что выражается величиной $\lg$ КОЕ 7,2 кл/мл при константе удельной скорости роста и скорости деления соответственно 0,18 и 0,13 ч⁻¹. Показатель, характеризующий время удвоения микробной клетки составил 5,43 ч. На основании выше изложенного следует, что трофические потребности культуры полностью обеспечиваются тем потенциалом питательных веществ, которые присутствуют в питательном субстрате.

Изменения величины жизнеспособных клеток в микробной популяции не наблюдается в течение последующих 48 ч от момента завершения экспоненциальной стадии развития периодической культуры. Это указывает на то, что она вступила в период стационарного развития. Вследствие этого концентрация микробной массы стабильно остается на одном уровне, за счет того, что количество погибших клеток в этот период времени соответствует числу вновь образованных.

При изучении влияния лазерного излучения на процесс фотомодификации жидкой питательной среды, используемой для культивирования, было установлено, что кривая роста отличается от контрольного варианта. Прежде всего, при внесении культуры в питательную среду модифицированную лазером в первые 24 и 48 ч культивирования при экспозиции 20 и 60 с, плотность микробной популяции снижается в 1,3 раза, достигая величины $\lg$ КОЕ 3,11 кл/мл. Летальный эффект соответственно составил 11,1 и 20,4 %. Кроме того, при экспозиции 20 с, концентрация клеток в периодической культуре в течение следующих 72 ч не изменяется, и только после 96 ч от начала культивирования, она увеличивается всего лишь на один порядок, что ниже контрольного значения в 1,5 раза. При экспозиции 60 с без длительного переходного периода культура выходит на экспоненциальную стадию развития, но ее концентрация ниже контрольного значения на три порядка.

На основании выше изложенного следует, что фотомодифицированная лазерным излучением питательная среда, обладая токсическим эффектом действия, влияет на рост и развитие периодической

культуры *S. cerevisiae*, так удельная скорость роста и скорость деления снижаются, а время генерации увеличивается в 1,9–3,7 раза в зависимости от экспозиции. Установленная закономерность связана с тем, что под воздействием лазерного излучения молекулы питательного субстрата, объединенные в кластеры, обеспечивая им химическую инертность, могут распадаться до более мелких химических радикалов. В результате этого когерентное монохроматическое излучение вызывает интенсивное движение заряженных участков или частиц макромолекул, создавая гомогенную смесь с меньшим числом крупных неоднородностей. Вследствие этого, усвоение молекул питательных веществ, а также использование их в метаболических реакциях снижается. Изменение процесса метаболизма является приспособительным механизмом, обеспечивающим выживание микробов в неблагоприятной среде их обитания. Кроме того, это ведет к изменению морфотипа. Так, в условиях опыта, в отличие от контроля, в котором наблюдается типичный морфотип, характеризующийся крупными клетками шаровидной формы, в микробной популяции опытного варианта сначала появляются клоны с удлиненной формой клетки, а позднее начинают формироваться конгломераты, образующие биопленку. Отмечаемый в контроле гетероморфизм, присущий для периода стационарного роста микробной популяции, связанный с формированием агрессивных условий в культуральной среде и активирующий процесс приспособления ее к поддержанию жизнеспособности, в опытных вариантах не наблюдается, поскольку культура не выходит в этот период развития. Можно отметить, что приспособительный механизм идет не в направлении усиления их жизнеспособности, а в приобретении ими большей физиолого-биохимической активности, которая обеспечивает формирование факторов защиты, за счет которых изменяется их вирулентность.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ/УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ГЕТЕРОТРОФНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Е. В. Суханова, Е. А. Зименс

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: sukhanova17@gmail.com

В настоящее время одной из важнейших проблем населения Земли становится загрязнение природных вод как биогенными элементами, так и микроорганизмами, поступающими в водоемы в результате антропогенного воздействия. Определение антибиотикорезистентности бактерий, является одним из информативных показателей такого воздействия на водоемы. Влияние человеческой деятельности на экосистемы крупнейших поверхностных водоемов, например, таких как оз. Байкал, может привести к их необратимым изменениям [Верхозина, 2014].

Цель работы – оценить влияния антропогенного фактора на распределение и биологические свойства бактерий, выделенных из различных биотопов озера Байкал.

Объектами исследования стали образцы биопленок, сформированных на различных твердых субстратах в литоральной зоне южной котловины озера Байкал, залив Лиственничный ($N51^{\circ}51'46.3''$, $E104^{\circ}50'47.1''$). Пластины были погружены на глубину 7–8 м водолазами ЛИН СО РАН в 2011 году и экспонировали в естественных условиях озера в течение года. Для выделения чистых культур использовали питательные среды: R2A (Fluka analytical, США), NSY, PCA и TSA (HiMedia, Индия). Длительность инкубации посевов составила 5–7 дней при 20–22 °С. Получена коллекция из 170 гетеротрофных штаммов бактерий.

В ходе экспедиционных работ на оз. Байкал в 2017 г. были отобраны пробы воды (нейстон, поверхностная вода, придонная вода и с глубины 5, 10, 20 и 25 м), эпилитических биоплёнок (по 3 валуна), а также больная и здоровая губки с четырех станций: п. Большие Коты, п. Большое Голоустное, Пролив Ольхонские ворота и бух. Ая. В результате микробиологических исследований на различных питательных средах (РПА/10, ПДС, R2A, МПА) была получена коллекция из 484 гетеротрофных штаммов бактерий: биопленки – 220, вода – 186 и губки – 78.

Определение антибиотикорезистентности микроорганизмов проводили методом диффузии в агар с помощью бумажных дисков, пропитанных антибиотиками: азитромицин (15 мкг), бензилпенициллин (10 ЕД), ванкомицин (30 мкг), амоксициллин + клавулоновая кислота (20 мкг/10 мкг), гентамицин (120 мкг), ампициллин (10 мкг), левомицетин (30 мкг), сульфаниламид (300 мкг), амоксициллин (20 мкг), тетрациклин (30 мкг), меропенем (10 мкг), набор ДИ-ПЛС-50–01 НИЦФ (г. Санкт-Петербург, Россия). Результаты оценивали по зонам лизиса культуры: высоко чувствительные – зоны лизиса 30 мм и более; чувствительные – от 12 до 30 мм; слабая чувствительные – 12 мм и менее; резистентные – 5 мм и менее.

Всего было протестировано на 11 антибиотиков 372 штамма из них: 131 штамм – из биопленок 2017 г., 96 штаммов – из биопленок 2012 г., 113 штаммов – из воды, 17 – здоровые губки и 20 – больные губки. Стоит отметить, что степень чувствительности/устойчивости к антибиотикам у изолятов из воды и эпипитических биопленок была сопоставима. Для штаммов, выделенных из эпипитических биопленок, наиболее эффективное антимикробное действие отмечено для азитромицина, ванкомицина, тетрациклина и меропенема. Для штаммов из эпипитических биопленок (коллекции 2012 г.) отмечен наибольший процент резистентных штаммов, например, для гентамицина отмечено 94 %, сульфаниламид – 91 % и бензилпенициллин – 81 %. Возможно, высокий процент устойчивых штаммов к данным антибиотикам в этой коллекции можно связать с высокой антропогенной нагрузкой биотопа, из которого они были выделены (п. Листвянка).

Кроме того, штаммы, выделенные из водной толщи, показали высокую устойчивость (70–82 %) к антибиотикам: сульфаниламид, бензилпенициллин, ампициллин и амоксициллин. Наиболее эффективным антибиотиком для них послужил меропенем.

Штаммы, выделенные из больных губок, показали высокую устойчивость (60–75 %) к антибиотикам: ампициллин, амоксициллин, ванкомицин, левомицетин, азитромицин, бензилпенициллин. Штаммы этой группы были чувствительны к таким антибиотикам как меропенем и тетрациклин.

Для штаммов, выделенных из здоровых губок, наибольший процент устойчивых штаммов показан для антибиотиков – сульфаниламид и азитромицин. В этой группе отмечен высокий процент чувствительных штаммов к большинству антибиотиков. Возможно, это связано с тем, что штаммы, выделенные из здоровых губок, от-

носятся к автохтонной микрофлоре, которая меньше всего подвергается антропогенному загрязнению по сравнению с микрофлорой эпиплитических биопленок и водной толщи.

Ранее другими авторами было показано наличие высокоустойчивых штаммов к различным антибиотикам в районах с антропогенной нагрузкой прибрежной зоны оз. Байкал [Верхозина и др., 2014].

Таким образом, из 372 проанализированных штаммов чувствительных ко всем антибиотикам 9 шт. (2,4 %) и 36 шт. устойчивых (10 %). Штаммы из эпиплитических биопленок, воды и больных губок показали самый высокий процент устойчивости к большинству использованных антибиотиков. В микробном сообществе здоровых губок преобладали штаммы чувствительные к антибиотикам, которые видимо являются автохтонной микрофлорой – стабильной и независимой от аллохтонной микрофлоры окружающей среды.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0345-2016-0003 (АААА-А16-116122110061-6) “Микробные и вирусные сообщества в биопленках ...” и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00443.

Литература

Верхозина Е. В., Верхозина В. А., Савилов Е. Д., Верхотуров В. В. Антибиотикоустойчивость микробного сообщества экосистемы озера Байкал в районе п. Листвянка, г. Слюдянки и г. Байкальска // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2014. № 3. С. 62–65.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К ВНЕШНЕМУ pH У АЛКАЛОФИЛЬНЫХ И АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

В. М. Терёшина¹, Е. А. Януцевич¹, О. А. Данилова¹,
С. А. Бондаренко^{1,2}, М. Л. Георгиева², Е. Н. Биланенко²

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

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

Алкалотолерантность широко распространена в мире грибов, тогда как явление облигатной алкалофилии очень редко и обнаружено у аскомицетов родов *Sodiomyces* (*Plectosphaerellaceae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*) и *Thielavia* (*Chaetomiaceae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*), обитающих в стабильно щелочных условиях на побережье содовых озер. Скорость роста алкалотолерантов слабо изме-

няется в диапазоне pH 4–11. К алкалофилам относят грибы, имеющие выраженный оптимум роста при pH выше 8 и не растущие при pH ниже 5 [Grum-Grzhimaylo et. al., 2016]. Мы предположили, что алкалотолеранты и алкалофилы используют различные механизмы защиты клеток от внешнего pH, поэтому в работе использовали два подхода – исследование осмолитной системы и состава мембранных липидов в условиях изменения внешнего pH.

Органическими осмолитами называют низкомолекулярные соединения различной химической природы, которые используются клетками для адаптации к неблагоприятным условиям. По современным представлениям органические осмолиты, являются не только «совместимыми соединениями» (compatible solutes), как считалось ранее [Brown, Simpson, 1972], но и метаболическими, и нейтрализующими цитопротекторами [Yancey, 2005]. У грибов осмолиты представлены, в основном углеводами и, иногда, аминокислотами, которые защищают клетки от обезвоживания, возникающего как при высушивании, так и при действии многих стрессорных факторов. Внимание к мембранным липидам было обусловлено тем, что по современным представлениям мембраны играют важную роль в защитных реакциях и регуляции метаболизма. Поддержание функционального состояния мембран при стрессе является ключевым звеном защитной системы и обеспечивается не только путем изменения их состава и структуры, но и стабилизирующим действием осмолита трегалозы [Vigh et. al., 2005; Glatz et. al., 2016].

Целью настоящего исследования было изучение изменений в составе углеводов цитозоля и мембранных липидов у представителей облигатно алкалофильных (*Sodiomyces tronii*, *S. magadii* и *S. alkalinus*), и алкалотолерантных (*Acrostalagmus luteoalbus*, *Chordomyces antarcticus* и *Emericellopsis alkalina*), грибов в ответ на изменения внешнего pH.

Грибы выращивали на сусло-агаровой среде с различным pH, создаваемым 0,2 М цитратного (pH 4, 5–5,9), 0,2 М фосфатного (pH 7,0) и 0,2 М карбонатно-бикарбонатного (pH 9–10) буферов в течение 7–10 сут. Все грибы, кроме *S. tronii*, обильно спороносили в активной фазе роста, образуя фиалоконидии с тонкой гиалиновой оболочкой. Углеводы цитозоля после экстракции и очистки анализировали методом ГЖХ с внутренним стандартом. Липиды экстрагировали методом Николса, разделяли методом одномерной и двумерной хроматографии. Количественный анализ липидов проводили с помощью денситометрии с использованием программы DENS. Состав жирных кислот фосфолипидов анализировали методом ГЖХ.

У всех изученных алкалофильных грибов, выращенных в оптимальных условиях pH 10,2, наблюдалось доминирование трех растворимых углеводов в цитозоле – маннита, трегалозы и арабита. В процессе роста алкалофила *S. tronii* количество и доля трегалозы в составе углеводов увеличивается двукратно. Снижение pH среды до 9,2 и 7 приводило к снижению до следового количества арабита и увеличению доли трегалозы. У алкалотолерантных грибов основными углеводами при всех изученных значениях pH были маннит и арабит, тогда как трегалоза присутствовала в небольшом количестве. Доля арабита увеличивалась при росте в щелочных условиях, в нейтральных и кислых преобладал маннит. Таким образом, сравнительное исследование выявило принципиальное различие в механизмах адаптации между алкалотолерантами и алкалофилами. Алкалофилы используют трегалозную защиту, тогда как у толерантов этот дисахарид присутствует в следовом количестве и не изменяется в ответ на колебания внешнего pH.

Характерной особенностью всех алкалоустойчивых грибов было присутствие в составе мембранных липидов большого количества фосфатидных кислот на ранних стадиях роста. Исследование состава мембранных липидов при различных pH не выявило общей закономерности. Так в ответ на снижение pH у алкалофила *S. tronii* наблюдалось существенное увеличение долей сфинголипидов и стерина на фоне снижения фосфатидилхолинов, что указывало на образование рафтов. Напротив, у *S. alkalinus*, *S. magadii*, повышалась доля фосфатидных кислот на фоне снижения фосфатидилхолинов и стерина, при этом доля сфинголипидов слабо изменялась. Такое же снижение уровня стерина при снижении pH отмечено и для алкалотолерантов, но на фоне увеличения доли одного из фосфолипидов. Общей закономерностью было увеличение степени ненасыщенности жирных кислот основных фосфолипидов при снижении pH.

Таким образом впервые было показано, что алкалофилия является особым явлением поскольку эти грибы используют трегалозную защиту для жизни в гиперщелочных условиях и адаптации к снижению внешнего pH.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-00488.

Литература

Brown A. D., Simpson J. R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols // J. Gen. Microbiol. 1972. Vol. 72, N 3. P. 589–591.

Glatz A, Pilbat A, Németh GL, Vince-kontár K Involvement of small heat shock proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. Cell Stress Chaperones. 2016. Vol. 21. P. 327–338.

Grum-Grzhimaylo AA, Georgieva ML, Bondarenko SA, et al On the diversity of fungi from soda soils. Fungal Diversity. — 2016. — V. 76. — P. 27–74.

Vigh L, Escribá P V., Sonnleitner A, et al. (2005) The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. Progress Lipid Research. 2005. Vol. 44. P. 303–344.

Yancey P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // Journal of Experimental Biology. 2005. Vol. 208, N 15. P. 2819–2830.

МИКРООРГАНИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С АМФИПОДАМИ И ОСТРАКОДАМИ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗОК ГАЗОСОДЕРЖАЩИХ МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ФЛЮИДОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

И. А. Хальзов, И. В. Механикова, Т. Я. Ситникова,
С. В. Букин, Т. И. Земская

Лимнологический институт СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: i_halz@lin.irk.ru

К существующим на дне озера Байкал метановым и нефтяным сипам, грязевым вулканам и гидротермальному источнику в бухте Фролиха приурочены разнообразные по своему составу биологические сообщества. Они включают в себя широкий спектр организмов от бактерий и микроскопических грибов до беспозвоночных животных [Намсараев и др., 1994; Zemskaya et al., 2012, Ситникова и др., 2017].

Целью наших исследований являлось изучение вероятных путей вовлечения в пищевые сети углерода разного происхождения (например, углерода метана) и других биогенных элементов с помощью методов электронной микроскопии и анализа фрагмента гена 16S рРНК. Одним из механизмов, обеспечивающих вовлечение углерода метана, могут быть симбиотические отношения между водными беспозвоночными и микробными сообществами, имеющими в своем составе метанотрофов [Goffredi et al., 2008].

Известно, что ракообразные могут выступать как непостоянный субстрат для разнообразных сообществ микроорганизмов. Эти ассоциации могут носить лишь факультативный, оппортунистический и неспециализированный характер, при этом эпобионт может колонизировать широкий спектр инертных растительных и животных субстратов. Но также известно, что некоторые виды простейших вовлечены в высокоспецифические ассоциации с субстратными организ-

мами, которые существуют исключительно у индивидуумов одного рода или вида [Gast, 2009].

В районе гидротермального источника в бухте Фролиха нам впервые удалось обнаружить на поверхности кутикулы байкальских эндемичных амфипод эпибиотические ассоциации инфузорий и прокариот. Эпибионты-инфузории палеарктического рода *Lagenophrys* (Peritrichia; Lagenophryidae) были найдены у пяти видов амфипод из 11 исследованных. Большая часть базибионтов принадлежала к одному из самых распространенных на илах глубинной зоны Байкала видов амфипод – зарывающегося пелофила *Macropereiopus florii*. С помощью сканирующей электронной микроскопии на поверхности разных частей тела амфипод обнаружены морфологически различающиеся клетки прокариот.

В районах метанового сипа Б. Голоустное и нефтяного сипа у мыса Толстый были отобраны образцы остракод *Candona* sp., на поверхности которых также обнаружены раковины *Lagenophrys* sp., образующие консорциум с микроорганизмами. Исследование с помощью сканирующей электронной микроскопии показало различную морфологию клеток микроорганизмов, а также выявило наличие особого минерального вещества, на котором располагаются бактерии.

Филогенетический анализ фрагмента гена 16S рПНК из ДНК, выделенной из амфипод и остракод, показал наличие последовательностей, принадлежащих в подавляющем большинстве филумам Bactroidetes и Proteobacteria. В обоих случаях отмечены последовательности, имеющие наибольшее сходство с представителями рода *Thiotrix* из озера Байкал. Последовательности относимые к представителям данного рода имели сродство с последовательностями микроорганизмов, обнаруженных на поверхности амфипод *Niphargus ictus*, которые обитают в карстовых пещерах [Dattagupta et al, 2009]. Только в образцах амфипод были обнаружены последовательности, имеющие наиболее высокий процент сходства с бесцветными серными бактериями рода *Thioploca* – основных матообразующих микроорганизмов района низкотемпературного гидротермального источника в районе б. Фролиха. В образцах остракод из метанового сипа были отмечены последовательности, относящиеся семейству *Flavobacteraceae*, которые имели высокое сходство с последовательностями микроорганизмов, обнаруженных в карстовых пещерах в синтрофной ассоциации с жуками *Cansiliella servadeii*, а также в микробных сообществах подземных вод и криоконита [Engel et al, 2013].

Около 50 % всех последовательностей, найденных в образцах остракод из метанового сипа, были отнесены к роду *Rickettsia* (Alphaproteobacteria), еще 3 % последовательностей к роду *Cardinium* (Bacteroidetes). Наличие риккетсий у пресноводных остракод показано впервые. Представители рода *Cardinium* для байкальских видов ракообразных также ранее не отмечались. Представителей метанотрофных бактерий, способных окислять метан, в ассоциациях с исследованными животными не выявлено.

Исследования выполнены в рамках государственного задания (0345-2016-0007) и гранта РФФИ № 18-34-00442.

Литература

Намсараев Б. Б., Дулов Л. Е., Дубинина Г. А. и др. Участие бактерий в процессах синтеза и деструкции органического вещества в микробных матах озера Байкал // Микробиология. 1994. Т. 63. № 2. С. 345–351.

Ситникова Т. Я., Сиделева В. Г., Кияшко С. И. и др. Сравнительный анализ сообществ макробеспозвоночных и рыб, ассоциированных с метановым и нефте-метановым сипами в абиссали оз. Байкал // Успехи соврем. биологии. 2017. Т. 137. № 4. С. 373–386.

Gast R. J., Sanders R. W., Caron D. A. Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes // Trends Microbiology. 2009. Vol. 1. 17, N 12. P. 563–569.

Goffredi S. K., Jones W. J., Erhlich H., Springer A., Vrijenhoek R. C. Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta* // Environmental Microbiology. 2008. Vol. 10. N 10. P. 2623–2634.

Zemskaya T. I., Sitnikova T. Y., Kiyashko S. I. et al. Faunal communities at sites of gas- and oil-bearing fluids in Lake Baikal // Geo-Marine Letters. 2012. Vol. 32. N 5. P. 437–451.

МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО В РАЙОНЕ ИЗЛИВА ГОРЯЧЕГО СЕРОВОДОРОДНОГО ИСТОЧНИКА В БУХТЕ ЗМЕИНАЯ, ОЗЕРО БАЙКАЛ

С. М. Черницына¹, Т. В. Погодаева¹,
Н. М. Дульцева², Т. И. Земская¹

¹Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, e-mail: sveta@lin.irk.ru

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

Бесцветные серобактерии участвуют в аккумуляции и кристаллизации серы и играют важную роль в поведении системы в целом, так как в ночное время окисление соединений серы оказывается основной статьей расхода кислорода. В озере Байкал серные бактерии обнаруживаются в районах с повышенным содержанием органического вещества и в присутствии восстановленных соединений серы, служат биологическим фильтром, препятствуя поступлению сероводорода.

В акватории озера Байкал обнаружены серные бактерии трех родов: *Thioploca*, *Thiothrix* и *Beggiatoa*. *Thioploca* широко распространена по всему озеру и в некоторых местах обитания формирует бактериальные маты [Земская и др., 2001, 2009]. *Beggiatoa* обнаружили в живых пробах, отобранных в горячем источнике Хакусы на берегу Байкала, *Thiothrix* формирует обширные белые маты в прибрежной зоне в б. Змеиная.

В б. Змеиная (Чивыркуйский залив) на берегу расположен горячий сероводородный источник. Температура воды в источнике достигает 34–45 °С, в прибрежной зоне в летний период ее значения составляют 17–23 °С. Вода гидрокарбонатно-сульфатная натриевая, содержит сероводород; минерализация 477,4 мг/л.

Развитие *Thiothrix* наблюдается в урзе воды, где они образуют поля размером от 1 до 10 м². Здесь содержание кислорода варьирует от 1,68 мг/л до 8,24 мг/л, сульфата – до 25,37 мг/л, рН воды достигает 8,5–8,95. *Thiothrix* не встречается в самом источнике, где отмечены анаоксигенные условия. Выдвинуто предположение, что бактерии рода *Thiothrix* защищают организмы (например, растения, мелкие животные), на которых образуют колонии, от агрессивного действия сероводорода.

Ранее нами были получены накопительные культуры *Thiothrix* из обрастаний собранных с камней. На твердом и полужидком агаре колонии *Thiothrix* давали рост на 2–4-е сут. как с добавлением ацетата и лактата, так и без них. Клетки *Thiothrix* обладали способностью образовывать гонидии, гормогонии, розетки. В лабораторных условиях рост *Thiothrix* отмечался на средах с широким диапазоном рН (7,5–8,8). Наличие органики, сульфидов кальция и железа в экспериментальных условиях на рост *Thiothrix* не оказывали влияния.

При анализе библиотеки ампликонов гена 16S рРНК (95 шт.) основная их часть (77 %) отнесена к *Thiothrix* spp. Филогенетический анализ показал, что бактерии рода *Thiothrix* формируют монофилетическую группу в пределах γ-протеобактерий с высокой бутстрэп-поддержкой (99 %). Представители этого рода наиболее близки сероокисляющим симбионтам и *Thiomicrospira* sp. Ближайшими гомологами байкальской серобактерии являются виды *Thiothrix fructosivorans* и *Thiothrix* СТ3, выделенные из активного ила.

15 % клонов имеют наибольшее сходство с некультивируемой бактерий, выделенной из грунтовых вод золотодобывающей шахты (DQ088741), осадков Балтийского моря (EF459884). Культивируемые гомологи относятся к роду *Hydrogenophaga* (β-протеобактерии),

выделены из почв (AB300163), пищеварительного тракта дафнии *Daphnia magna* (HQ113382). Представители этого рода являются факультативными водород-окисляющими хемоорганотрофами или хемолитоавтотрофами.

Также обнаруживаются другие представители β -протеобактерий – порядок *Burkholderiales*, ближайший культивируемый гомолог *Tepidicella xavieri* (NR_043697, 99 %). Культивируемые и некультивируемые гомологи выделены на излитии горячих источников, в т. ч. в Йеллоустонском национальном парке. Все виды этого рода являются умеренными термофилами. Кроме того, в сообществе *Thiothrix* обнаружены последовательности бактерий семейства *Comamonadaceae*, способные к разрушению полициклических ароматических углеводов в бескислородных условиях (99 %, MF314734).

Вторым по количеству последовательностей представителем сообщества матов является представитель филума *Bacteroidetes*, род *Saprospira*. Ближайший гомолог (99 %) байкальской последовательности AY929064 *Saprospira* sp. PdY3 обладает альгицидной активностью против цианобактерий. Бактерии этого рода также лизируют некоторые виды бактерий, захватывая их, являются строгими аэробами и разрушают многие сложные биомолекулы.

В бактериальных матах обнаружены цианобактерии рода *Leptolyngbya*. Ранее этот род выделен и описан как основной для источника Змеиный [Сорокикова и др., 2007]. Цианобактерии этого рода широко распространены в термальных источниках Северного Байкала и в большинстве являются доминирующими. Отмечается, что они преобладают при температуре выше 40⁰С, при ее понижении происходит смена сообщества и развивается *Thiothrix*.

В составе матов также встречаются представители γ -протеобактерий, семейства *Xanthomonadaceae*, род *Thermomonas*. Байкальский представитель гомологичен (99 %) типовому штамму *Thermomonas haemolytica*, выделенному из глины с оптимумом роста 37–50 °С.

Таким образом, в бактериальных матах, основу которых составляет бесцветная серная бактерия рода *Thiothrix*, отмечаются разные виды бактерий, большей частью термофильные.

Работа выполнена в рамках темы гос. задания 0345–2019–0007 и гранта РФФИ-офи_м 17-29-05040.

Литература

Земская Т. И., Намсараев Б. Б., Дульцева Н. М., Ханаева Т. А., Голобокова Л. П., Дулов Л. Е. Пространственное распределение бактерий различных физиологических групп в

районе подводного термального источника в бухте Фролиха, Северный Байкал // Микробиология. 2001. Т. 70, № 3. С. 429–431.

Земская Т. И., Черницына С. М., Дульцева Н. М., Сергеева В. Н., Погодаева Т. В., Намсараев Б. Б. Бесцветные серные бактерии рода *Thioploca* из различных районов озера Байкал // Микробиология. 2009. Т. 78, № 1. С. 134–143.

Сороковикова Е. Г., Белых О. И., Лихошвай Е. В. Цианобактерии термальных источников байкальской рифтовой зоны: видовой состав, ультраструктура клеток, биоминерализация кремния // Современная палеонтология: классические и новейшие методы. М. : ПИН. 2007. С. 11–18.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ СВЯЗАННОГО АЗОТА И УГЛЕРОДА НА СОСТАВ БАЙКАЛЬСКОГО МЕТАНОТРОФНОГО СООБЩЕСТВА

О. В. Шубенкова¹, А. С. Захаренко¹, И. В. Морозов²,
Ю. П. Галачьянц¹, Г. В. Калмычков³, Т. В. Погодаева¹,
Т. И. Земская¹

¹Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, e-mail: olya@lin.irk.ru

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск e-mail: Mor@niboch.nsc.ru

³Институт геохимии им. Виноградова СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: gkalm@igc.irk.ru

Озеро Байкал характеризуется наличием выходов метана, нефти и приповерхностных газовых гидратов [Khlystov et al., 2013]. Метанотрофные бактерии (МОБ) являются уникальной группой микроорганизмов функционально специализированной на аэробном использовании метана в качестве единственного источника углерода и энергии [Hanson, 1996] и выполняют функцию биологического фильтра, препятствующего поступлению метана в атмосферу [Малашенко и др., 1978]. Помимо этого, МОБ вносят значительный вклад в глобальный цикл азота, вовлекая в свой метаболизм нитраты, нитриты и аммоний. Поскольку осадки озера Байкал характеризуются низким содержанием азотных соединений [Pogodaeva et al., 2017], то конкуренция за данный биогенный субстрат очень велика. Проведен лабораторный эксперимент по влиянию различных источников связанного азота (KNO_3 и NH_4Cl) и углерода (метанол в конц. 0,01 %, 0,5 % и метан 4 об %) на формирование и биоразнообразие байкальского метанотрофного сообщества в накопительных культурах, полученных при культивировании окисленного слоя донного осадка (0–5 см) района глубоководной разгрузки метана Посольская Банка (Южный Байкал). Культивирование природного микробного сообщества проводилось на жидкой минеральной среде Виттенбери

(Whittenbury) в условиях, приближенных к байкальским (температура 10 °С, pH 6,8–7,2). С помощью метода высокопроизводительного массового параллельного секвенирования проанализирована бактериальная ДНК полученных накопительных культур и нативного осадка данного образца. Секвенирование было проведено на платформе Illumina MiSeq в центре коллективного пользования «Геномика», Новосибирск. В результате пиросеквенирования региона V2-V3 гена 16S rRNA было получено 192 074 последовательностей со средней длиной 430 п. н. В полученных библиотеках сообществ нативного осадка метанотрофные бактерии были представлены порядком *Methylococcales* и составили 6,4 %. Из них 4,8 % принадлежит облигатным метанотрофам рода *Methylobacter* (I тип). При культивировании МОБ с использованием метана (4 об %) в качестве единственного источника углерода и энергии развивалось метанотрофное сообщество I типа, последовательности которых не имеют культивируемых гомологов и образуют на филогенетическом древе отдельный кластер. Нужно отметить, что в присутствии NH₄Cl в среде разнообразия метанотрофных бактерий было заметно выше. При внесении в среду даже небольших концентраций метанола (0,01 %) происходит заметный сдвиг в сообществе в сторону облигатных метилотрофных бактерий рода *Methylothermobacter*. Увеличение концентрации метанола до 0,5 % привело к угнетению роста метанотрофных бактерий и доминированию в сообществе метилотрофных бактерий порядка *Methylophilales*.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме 0345-2019-0007; гранта офи_м 17-29-05040; РФФИ № 18-34-00442 мол_а.

Литература

- Малашенко Ю. Р., Романовская В. А., Троценко Ю. А. Метаноокисляющие микроорганизмы. М.: Наука, 1978. 198 с.
- Hanson R. S., Hanson T. E. Methanotrophic bacteria // Microbiology Review. 1996. Vol. 60, Is. 2. P. 439–471.
- Khlystov O., De Batist M., Shoji H., Hachikubo A., Nishio S., Naudts L., Poort J., Khabuev A., Belousov O., Manakov A., Kalmychkov G. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties // J. Asian Earth Sci. 2013. Vol. 62. P. 162–166.
- Pogodaeva T., Lopatina I., Khlystov O., Egorov A., Zemskaya T. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments // Journal of Great Lakes research. 2017. Vol. 43. P. 1030–1043. doi: 10.1016/j.jglr.2017.09.003.

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

РАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ БЕЛОГО МОРЯ

О. И. Бурцева, А. А. Кублановская, О. И. Баулина,
Т. А. Федоренко, Е. С. Лобакова, К. А. Чеканов

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, г. Москва,
e-mail: burtseva. olga.2409@yandex.ru

Люминесцентные бактерии широко распространены в водных морских биотопах [Dunlap, 2014]. Однако встречаются пресноводные виды, а также симбионты почвенных нематод [Dunlap, 2014]. Способность к биолюминесценции выборочно встречается у филогенетически несвязанных групп бактерий. На данный момент выделен и описан целый ряд штаммов люминесцентных бактерий из морской воды, морских рыб и беспозвоночных животных [Shilo and Yetinson, 1979] тропических морей. На этом фоне, разнообразие люминесцентных микроорганизмов морей высоких широт, в том числе Белого моря, изучено сравнительно слабо. Настоящая работа посвящена выделению и молекулярно-биологической идентификации люминесцентных бактерий-симбионтов рыб Белого моря.

В июле – августе 2018 года в акватории Кандалакшского залива Белого моря проводили вылов донных и пелагических рыб, характеризующихся разными ареалами. Предварительное обездвиживание рыбы проводили путем разрушения спинного мозга с помощью препаровальной иглы или скальпеля. Исследование сопровождалось видовой идентификацией рыб и морфометрией.

Люминесцентные бактерии выделяли и с поверхности тела и из различных органов с применением стандартных микробиологических методик. Использовали селективную среду, отличительной особенностью которой было повышенное содержание хлорида натрия [Aleskerova et al., 2017].

Генотипирование полученных штаммов бактерий осуществляли на основании последовательностей генов 16S rRNA и GyrB.

Летом 2018 г. было проведено выделение штаммов люминесцентных бактерий из рыб пяти видов: *Myoxocephalus scorpius* (Scorpaeniformes, Cottidae), *Agonus cataphractus* (Scorpaeniformes, Agonidae), *Liopsetta glacialis* (Pleuronectiformes, Pleuronectidae), *Gadus morhua* marisalbi (Gadiformes, Gadidae), *Clupea pallasii* (Clupeiformes, Clupeidae). Всего было выделено 15 штаммов бактерий (Таблица).

Отмечено, что люминесцентные бактерии распределены в организме рыб неравномерно. В ходе работы не удалось выделить штаммы бактерий из селезенки, почек и гонад. Большая часть штаммов была получена из различных отделов желудочно-кишечного тракта: желудка, переднего и заднего отдела кишечника (табл. 1). По одному штамму выделено из печени и с поверхности тела. Выделить штаммы светящихся бактерий удалось лишь из взрослых особей рыб. Органы мальков бактерий не содержали, из чего можно сделать вывод, что заселение люминесцентными бактериями желудочно-кишечного тракта рыб происходит в процессе роста. Полагают, что микроколонии люминесцентных бактерий находятся в донных отложениях и в толще воды, где они ассоциированы с мелкими частичками разлагающихся органических веществ. В организм рыб бактерии попадают с пищей и/или током воды [Dunlap, 2014].

Путем анализа последовательности 16S rRNA и GyrB установлено, что полученные штаммы относятся к пяти различным родам: *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Kosakonia*, *Shewanella* (табл. 1). Бактерии *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio* из семейства Vibrionaceae являются классическим примером светящихся прокариот [Dunlap, 2014]. Среди бактерий, принадлежащих к родам *Photobacterium* и *Aliivibrio*, описано много симбионтов морских животных. Представителей же рода *Vibrio* чаще относят к сапрофитным организмам [Dunlap, 2014]. Для бактерий рода *Schewanella* и некоторых представителей Enterobacteriaceae также ранее описана способность к биолюминесценции [Dunlap, 2014]. Известно, что представители Enterobacteriaceae (род *Photorhabdus*) встречаются в кишечнике почвенных нематод [Dunlap, 2014]. Для рыб светящиеся представители рода Enterobacteriaceae ранее не описаны. Поэтому выделенный штамм

Kosakonia cowanii 16LXy78 мог исходно являться не эндосимбионтом непосредственно кишечника рыбы-хозяина, а быть симбионтом нематод, массово развивающихся в переднем отделе кишечника рыб.

Таблица

Штаммы люминесцентных бактерий, выделенные из различных видов рыб Белого моря

Штамм	Род/Вид	Семейство	Животное-хозяин	Источник
1LMs78	<i>Aliivibrio logei</i>	Vibrionaceae	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	кишечник
4LMs78	<i>Aliivibrio logei</i>	Vibrionaceae	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	кишечник*
7LMs78	<i>Photobacterium toruni</i>	Vibrionaceae	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	кишечник
8LMs78	<i>Vibrio splendidus</i>	Vibrionaceae	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	кишечник
9LMs78	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Vibrionaceae	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	кишечник
12LMs78	<i>Photobacterium toruni</i>	Vibrionaceae	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	кишечник
13LXy78	<i>Aliivibrio sifiae</i>	Vibrionaceae	<i>Liopsetta glacialis</i>	кишечник
14LXy78	<i>Aliivibrio logei</i>	Vibrionaceae	<i>Agonus cataphractus</i>	печень
15LXy78	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Vibrionaceae	<i>Gadus morhua marisalbi</i>	Жаберная крышка (соскоб)
16LXy78	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Vibrionaceae	<i>Gadus morhua marisalbi</i>	Желудок
17LGm78	<i>Kosakonia cowanii</i>	Enterobacteriaceae	<i>Gadus morhua marisalbi</i>	Кишечник
18LGm78	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Vibrionaceae	<i>Gadus morhua marisalbi</i>	Кишечник
19LGm78	<i>Kosakonia cowanii</i>	Enterobacteriaceae	<i>Gadus morhua marisalbi</i>	Кишечник
20LCp78	<i>Shewanella baltica</i>	Shewanellaceae	<i>Clupea pallasii</i>	Желудок
21LCp98	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Vibrionaceae	<i>Clupea pallasii</i>	Желудок

Указана их видовая/родовая принадлежность и семейство на основании генотипирования и орган выделения. * – образец для выделения содержал также нематод кишечника рыб

В результате уточнения систематика рода *Aliivibrio*, одного из наиболее крупных родов люминесцентных бактерий, систематиче-

ское положение целого ряда штаммов неоднократно менялось [Ast et al., 2009]. В настоящее время принято выделять следующие виды в составе данного рода: *A. logei*, *A. wodans*, *A. thorii* и *A. sifiae*, также упоминаются *A. finisterrensis* и патогенный вид *A. salmonicida* [Ast et al., 2009; Dunlap, 2014]. Большая часть бактерий рода *Aliivibrio*, полученных в работе, находится в кладе *A. logei*, выделенного из *A. cataphractus*, и близкого к виду *A. sifiae*. Следует отметить, что полученные данные свидетельствуют об отсутствии специфической приуроченности родов и видов люминесцентных бактерий к определенным видам рыб. Кроме того, бактерии, выделенные из рыб одного вида, могут принадлежать к разным родам и видам (в том случае, если считать понятие вида применимым для описания разнообразия бактерий). Вместе с тем, наиболее часто из образцов исследованных рыб выделяются бактерии двух родов – *Aliivibrio* и *Photobacterium*. Среди выделенных штаммов привлекают особое внимание представители «неканонических» для люминесцентных бактерий родов – *Shewanella* и *Kosakonia*.

Пять штаммов, относящихся к разным родам, были исследованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Клетки всех изученных штаммов имеют палочковидную форму, граммотрицательны, подвижны за счёт наличия жгутиков. Исследование с ТЭМ негативно окрашенных клеток позволило установить морфологические особенности представителей разных родов.

Полученные в работе данные о биоразнообразии люминесцентных бактерий в рыбах Белого моря представляются перспективными для дальнейших исследований.

Таким образом, люминесцентные бактерии Белого моря относятся к филогенетически различным группам и достаточно полно описывают разнообразие известных прокариот, способных к биолюминесценции.

Литература

- Aleskerova L. E., Alenina K. A., Efremenko E. N., Ismailov A. D. The factor stabilizing the bioluminescence of PVA-immobilized photobacteria // Microbiology. 2017. Vol. 86, N 2. P. 218–224.
- Ast J. C., Urbanczyk H., Dunlap P. V. Multi-gene analysis reveals previously unrecognized phylogenetic diversity in *Aliivibrio* // Systematic and Applied Microbiology, 2009. Vol. 32, N 6. P. 379–386.
- Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology. Berlin, Heidelberg : Springer, 2014. Vol. 1. P. 37–64.
- Shilo M., Yetinson T. Physiological characteristics underlying the distribution patterns of luminous bacteria in the Mediterranean Sea and the Gulf of Elat // Applied and Environmental Microbiology. 1979. Vol. 38, N4. P. 577–584.
- Widder E. A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity // Science. 2010. Vol. 328, N 5979. P. 704–708.

ВЛИЯНИЕ АУКСИНА И ЦИТОКИНИНА НА МОРФОГЕНЕЗ КОРНЕВОГО КЛУБЕНЬКА У БОБОВОГО РАСТЕНИЯ

А. К. Глянько

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

Ауксины и цитокинины играют ключевую роль в процессах формирования бобово-ризобиального симбиоза (БРС) и осуществляют инициацию органогенеза корневых клубеньков [Liu et al., 2015]. Под влиянием цитокининов у бобового растения происходит экспрессия синтеза ранних белков – нодулинов (ENODs), характерных для раннего этапа БРС. Причем ризобиальная инфекция повышает содержание цитокининов и таким образом способствует синтезу ENODs. Ингибиторы транспорта ауксина известны как индукторы образования псевдоклубеньков и инициации экспрессии гена *ENOD40*, ассоциированного с формированием корневого клубенька [Mathesius et al., 2000].

Транс-зеатин (цитокинин) способен активировать клубенькообразование (нодуляцию) у бобовых в опытах с ризобиями, дефектными по синтезу Nod-факторов (NFs) (липохитоолигосахаридов) – ризобиальных специфических сигнальных молекул, играющих в ризобиальной инфекции основную роль [Глянько, 2014]. NFs активируются растительными рецептор-подобными киназами (LysM-RLK, LRR-RLK) на плазмалемме эпидермальных клеток, что запускает сигнальные системы растения-хозяина. Считается, что NFs – первоначальные триггеры процессов, изменяющих направленность метаболизма растения-хозяина и ведущих к созданию симбиотрофного организма [Ferguson et al., 2010]. NFs индуцируют транскрипционный фактор NIN (nodule inception) и запускают через активацию рецептора гистидинкиназы (CRE1) – цитокининовый сигналинг. В результате блокируется транспорт ауксина из надземных органов посредством ингибирования транспортных белков (PINs, PGP, NPA), что ведет к накоплению цитокинина, инициирующего морфогенез клубенька (рис.). Важная роль цитокинина в формировании клубенька подтверждена генетическими исследованиями [Tirichine et al., 2007]. Обсуждается вопрос о двух механизмах инициации органогенеза клубенька: активация NFs и индукция цитокинином. Важным доказательством в использовании второго механизма (вместо NFs) в инициации образования примордия клубенька (деления кор-

тикальных клеток) может быть проникновение некоторых видов ризобий в кортикальные клетки через трещины в эпидермисе, минуя корневые волоски. Доказывая репрессивную роль ауксина в инициации морфогенеза клубенька, можно предполагать о последующей положительной функции ауксина на более поздних стадиях органогенеза клубенька. Таким образом, цитокинин и ауксин – ключевые регуляторы в инициации органогенеза клубенька в кортексе корня. Модуляция этих гормонов происходит под влиянием NFs, которые активируются RLK. Наблюдаемый после этого каскад реакций (экспрессия симбиотических генов, синтез ранних ENODs, белков транскрипционных факторов и др. процессов) приводит к инфицированию тканей корня ризобиями и формированию клубеньков.

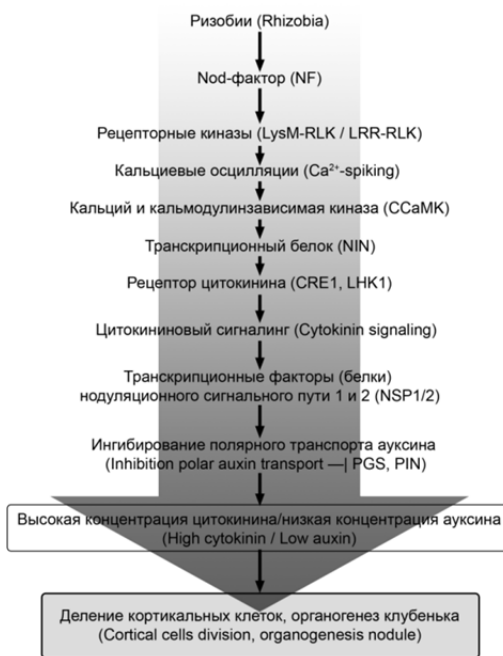


Рис. Морфогенез клубенька с участием цитокинина и ауксина

Литература

Глянько А. К. Роль Nod-фактора *Rhizobium* в индукции сигнальных систем растения при формировании бобово-ризобиального симбиоза // Вестник Харьковского нац. аграрного университета. Сер. Биология. 2014. Вып. 3 (33). С. 6–14.

Downie J. A. Infectious heresy // Science. 2007. Vol. 316, N 5829. P. 1296–1297.

Ferguson B. J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin Y.-H., Reid D. E., Gresshoff P. M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation // J. Integr. Plant Biol. 2010. Vol. 52, N 1. P. 61–76.

Liu C.-W., Breakspear A., Roy S., Murray J. D. Cytokinin response counterpoint auxin signaling during rhizobial infection // Plant Signal Behavior. 2015. Vol. 10. e1019982.

Trichine L., Sandal N., Madsen L. H., Radutoiu S., Albrechtsen A. S. A gain – of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis // Science. 2007. Vol. 315, N 5808. P. 104–107.

СКРИНИНГ АГЛ-СИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ *DACTYLORHIZA INCARNATA* (L.) SOÓ (ORCHIDACEAE)

Ю. В. Зайцева, А. В. Сидоров, О. А. Маракаев

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова,
г. Ярославль, e-mail: zjv9@mail.ru

Важную роль на различных этапах формирования микробно-растительных сообществ играют бактериальные Quorum Sensing (QS) системы межклеточной коммуникации. Это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы (аутоиндукторы), легко диффундирующие из клеток в среду и обратно, и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы. Наиболее изучены QS системы грамотрицательных бактерий, функционирующие с участием N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ). Эти сигнальные молекулы осуществляют как межклеточную коммуникацию внутри одного вида бактерий, так и межвидовую, а также взаимодействие между бактериями и высшими организмами [Fuqua, 1994; Зайцева, 2014].

Ассоциированные с растениями бактериальные сообщества способны синтезировать АГЛ, которые могут оказывать влияние как на состав микробиоты, так и на важные процессы жизнедеятельности растений. АГЛ-синтезирующие бактерии, а также синтетические молекулы АГЛ, способны стимулировать рост растения и корнеобразование, а также индуцировать системную устойчивость против широкого спектра патогенов у различных видов растений [Зайцева, 2014]. Идентификация ассоциированных с растениями микроорганизмов, которые способны активно синтезировать сигнальные молекулы QS, может иметь важное значение для понимания механизмов растительно-микробных взаимодействий. Тем не менее, в настоящее время, данные о разнообразии АГЛ в природных экосистемах и их

потенциальном воздействии на здоровье растений все еще ограничены, а для растений семейства Orchidaceae практически отсутствуют.

Целью данной работы являлось изучение разнообразия и особенностей распространения АГЛ-синтезирующих бактерий в микробном сообществе растения *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae).

Выделение микроорганизмов, ассоциированных с *D. incarnata*, проводили методом посева на питательные среды из почвенных и растительных образцов. Штаммы бактерий предварительно были идентифицированы на основании микробиологических и биохимических тестов. Для более точной идентификации использовали молекулярно-генетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

Для анализа сигнальных молекул, продуцируемых бактериями, использовали биосенсоры *Chromobacterium violaceum* CV026 [McClellan, 1997] и *Agrobacterium tumefaciens* NTL4/pZLR4 [Farrand, 2007; Steindler, 2002].

Биосенсор *Chromobacterium violaceum* CV026 поддерживали на среде LA с канамицином (100 мкг/мл). Для определения АГЛ клетки штамма *C. violaceum* CV026 высевали штрихами на поверхность агаризованной среды LB, пересекали эти штрихи штрихами тестируемых культур, каждой по отдельности, инкубировали 48 ч при 30 °С. В случае, когда штамм продуцирует АГЛ, наблюдалось окрашивание индикаторного штамма (CV026) в фиолетовый цвет за счет синтеза клетками пигмента виолацеина.

Биосенсор *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 выращивали на среде LB с добавлением ампицилина (100 мкг/мл) и гентамицина (20 мкг/мл) при 30 °С. Чашку с нижней агаризованной средой М9 с добавленным X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактозид; конечная концентрация 80 мкг/мл) заливали 3 мл верхнего мягкого агара М9 (0,5 %) при температуре 45 °С с добавлением 0,1 мл ночной культуры *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Тестируемые на продукцию АГЛ штаммы высевали уколами на поверхность агаризованной среды после ее застывания, инкубировали при температуре 30 °С от 24 до 48 ч. О синтезе АГЛ тестируемыми штаммами судили по появлению голубых зон гидролиза X-Gal.

Биосенсор *C. violaceum* CV026 чувствителен к молекулам АГЛ с длиной ацильной боковой цепи от 4 до 8 атомов углерода. Биосенсор *A. tumefaciens* NTL4/pZLR4 позволяет определять широкий ряд АГЛ, включая длинноцепочечные. Таким образом, сочетание двух биосенсоров позволило нам наиболее полно охарактеризовать весь

спектр АГЛ-синтезирующих бактерий микробного сообщества *D. incarnate*.

Наши результаты показали, что приблизительно 8–12 % культивируемых бактерий, ассоциированных с *D. incarnata*, обладают способностью синтезировать АГЛ. Филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК показал, что отобранные изоляты принадлежали к классам Gammaproteobacteria (97 %) и Alphaproteobacteria (3 %). Все АГЛ-синтезирующие бактерии из класса Alphaproteobacteria являлись представителями рода *Rhizobium*, тогда как АГЛ-синтезирующие бактерии из класса Gammaproteobacteria, были представлены родами *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Yersinia*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 18-34-00646).

Литература

- Зайцева Ю. В., Попова А. А., Хмель И. А. Регуляция типа Quorum Sensing у бактерий семейства Enterobacteriaceae. (Обзор) // Генетика. 2014. Т. 50, № 4. С. 373–391.
- Farrand S. K., Qin Y., Oger P. Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility // Methods Enzymol. 2002. Vol. 358. P. 452–84.
- Fuqua, W. C., Winans S. C. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // J. Bacteriol. Vol. 176, № 2. P. 269–75.
- McClellan K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology. 1997. Vol. 143. P. 3703–3711.
- Steindler L., Venturi V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors // FEMS Microbiol. Lett. 2007. Vol. 266, N 1. P. 1–9.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ВОДЫ НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ НЕЙСТОНА ОЗ. БАЙКАЛ

О. Н. Изосимова, А. Д. Галачянц,
Г. В. Подлесная, О. И. Белых

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: agniagal@lin.irk.ru

В мае – июне и августе 2018 г. проведено исследование общей численности бактерий поверхностном микрослое и подповерхностном слое воды озера Байкал. Средние значения общей численности бактерий составили в мае-июне $4,4 \pm 0,4 \times 10^6$ кл/мл в поверхностном микрослое, $1,9 \pm 0,5 \cdot 10^6$ кл/мл в подповерхностном слое воды; в августе $7,5 \pm 1,5 \cdot 10^6$ кл/мл в поверхностном микрослое, $3,2 \pm 0,5 \cdot 10^6$ кл/мл

в подповерхностном слое воды (рис.). Обнаружены значимые различия между общей численностью бактерий в поверхностном микрослое и подповерхностном слое воды.

Исследован химический состав поверхностного микрослоя и подлежащего слоя воды на глубине 15–20 см (табл.). Показано, что в мае-июне содержание фосфатов (PO_4^{3-}) и нитратов (NO_3^-) было значимо выше, чем в августе (тест Манна – Уитни – Вилкоксона, $p < 0,05$). Данный факт объясняется истощением биогенных элементов в воде к августу в результате их потребления активно развивающейся биотой. В августе в период летней стратификации выявлены значимые различия между содержанием фосфатов, общего азота, общего фосфора и общего органического углерода между ПМС и ПС (тест Манна – Уитни – Вилкоксона, $p < 0,05$), что свидетельствует об обогащении поверхностного микрослоя биогенными элементами и органическими веществами. Кроме того, в августе ПМС отличался от ПС повышенной мутностью, т. е. большим содержанием взвешенных частиц. Интересно отметить, что в мае – июне не было обнаружено значимых отличий в содержании фосфатов, общего фосфора, общего азота, а также в мутности между ПМС и ПС, что можно связать с интенсивным перемешиванием поверхностных вод весной в период перехода от обратной температурной стратификации к прямой [Шимараев, Гранин, 1991].

Таблица

Средние значения концентраций химических веществ в ПМС и ПС оз. Байкал в мае-июне и в августе 2018 г.

Месяц	Слой воды	PO_4^{3-} , мг/дм ³	NO_3^- , мг/дм ³	Р общ., мг/дм ³	Н общ., мг/дм ³	ТОС, мг/дм ³	Мутность, ЕМФ
Май – июнь	ПМС	0,1±0,01	0,4±0,01	0,031±0,017	0,1±0,01	нд	4±1,8
	ПС	0,03±0,002	0,4±0,01	0,012±0,001	0,1±0,004	нд	12±0,2
Август	ПМС	0,005±0,003	0,1±0,03	0,019±0,003	0,23±0,03	6±2	19±0,6
	ПС	0,002±0,001	0,1±0,03	0,008±0,0003	0,1±0,01	2±0,1	8±0,2

Примечание. Общ. общий; ТОС – общий органический углерод; нд – нет данных. После знака «±» приводится величина стандартной ошибки среднего при уровне значимости 0,05.

Найдена значимая прямая корреляционная связь между численностью как культивируемых гетеротрофных бактерий, так и ОЧБ в поверхностном микрослое и мутностью воды в августе (коэффици-

ент корреляции Спирмена составил 0,7 для культивируемых бактерий и 0,6 для ОЧБ, $p < 0,05$). Показано, что бактерии, ассоциированные с частицами различного происхождения, составляют значительную долю всех бактерий, находящихся в ПМС (23 ± 1 % по данным [Aller et al., 2005]; $28,98$ – $41,8$ % по данным [Santos et al., 2011]), поэтому наличие корреляции между мутностью и численностью бактерионефтона представляется закономерным. В августе выявлена значимая прямая корреляционная связь между ОЧБ и содержанием общего фосфора (Р) как в ПМС, так и в ПСВ (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,7, $p < 0,05$).

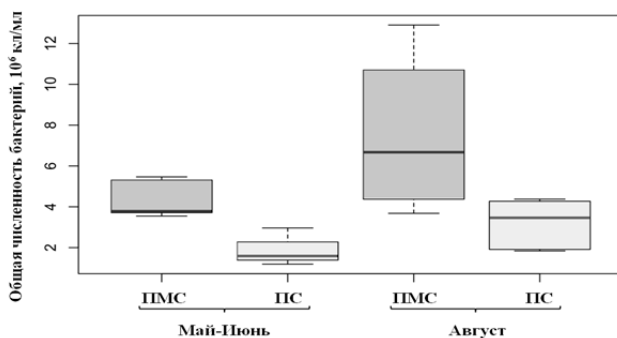


Рис. Общая численность бактерий в ПМС и ПС оз. Байкал в мае – июне и в августе 2018 г.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0345-2019-0003 (AAAA-A16-116122110061-6) «Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем...», № 0345-2019-0008 (AAAA-A16-116122110065-4) «Оценка и прогноз экологического состояния озера Байкал», проекта РФФИ № 18-34-00309 (учет общей численности бактерий).

Литература

- Шимараев М. Н., Гранин Н. Г. К вопросу о стратификации и механизме конвекции на Байкале // Докл. АН СССР. 1991. Т. 321, № 2. С. 381–385.
- Aller J. Y., Kuznetsova M. R., Jahns C. J., Kemp P. F. The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols // J Aerosol Sci. 2005. Vol. 36, N 5–6. P. 801–812.
- Santos L., Santos A. L., Coelho F. J. R. C., Gomes N. C. M., Dias J. M., Cunha A., Almeida A. Relation between bacterial activity in the surface microlayer and estuarine hydrodynamics // FEMS Microbiol. Ecol. 2011. Vol. 77, N 3. P. 636–646.

ВЛИЯНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ И ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ цАМФ И NO В КОРНЯХ ГОРОХА НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

А. А. Ищенко, Н. В. Филинова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: aspt25@yandex.ru

Патогенные и мутуалистические растительно-микробные взаимодействия широко распространены в природе и имеют много общего. В их основе лежат подавление или преодоление защитных реакций растения-хозяина, что приводит к колонизации его клеток. Растения, как и животные, воспринимают приходящие из окружающей среды сигналы различной природы и с помощью генетического аппарата реагируют на них соответствующим образом. В свою очередь, микроорганизмы тесно взаимодействуют с растительными сигнальными системами, создавая благоприятные условия для своего роста и развития. Имеется ряд доказательств того, что одним из триггеров сигнальных событий в клетках растений является аденилатциклазная сигнальная система, когда в первую очередь, под воздействием элиситоров активируется трансмембранная аденилатциклаза с участием G-белков, что приводит к резкому и кратковременному возрастанию уровня цАМФ, который оказывает влияние на генерацию оксида азота (NO) [Глянко, 2015, Ломоватская и др., 2018].

В связи с этим целью настоящей работы было изучить влияние клубеньковых и патогенных бактерий на динамику уровня цАМФ и NO в корнях проростков гороха.

Объектом исследования служили проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Рондо, выращенные в кюветах на влажной фильтровальной бумаге, в которых в течение часа с интервалом в 10 мин определяли содержание цАМФ и NO. Для инокуляции растений использовали клубеньковые бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* эффективного производственного штамма (CIAM 1022), которые отличаются умеренной способностью колонизировать корневую систему растения-хозяина, образуя при этом хорошо развитые клубеньки, эффективно фиксирующие азот; неэффективного производственного штамма (CIAM 1064), которые отличаются тем, что более агрессивно колонизируют корневую систему растения-хозяина, что в свою очередь приводит к образованию на корнях растений гороха большого количества мелких недоразвитых клубеньков, не способных к азотфиксации; и патогенные бактерии *Pseudomonas syringae*

rv. *pisi*, вызывающие бактериальный ожог гороха. В качестве контроля использовались проростки, выращенные на воде.

В результате проведённых экспериментов были получены следующие данные:

– при взаимодействии, как с симбиотическими, так и с патогенными бактериями уровень цАМФ увеличивался по сравнению с контрольным вариантом (рис.). При этом показаны существенные различия в динамике цАМФ при контакте с различными бактериями. Так при инокуляции эффективным штаммом клубеньковых бактерий максимальная концентрация цАМФ (149 % от контроля) наблюдалась на 30-й мин эксперимента; самый высокий уровень цАМФ при взаимодействии с неэффективным штаммом ризобий отмечен в промежутке 30–50 мин (увеличение при этом составило порядка 200 % от контроля), а заражение патогеном приводило к повышению цАМФ, которое достигало своего максимума к 20 мин (184 % от контроля). Обращает на себя внимание тот факт, что в период 0–20 мин существенных изменений уровня цАМФ при взаимодействии с ризобиями не наблюдалось, в то время как патоген вызывал повышение концентрации цАМФ с первых минут;

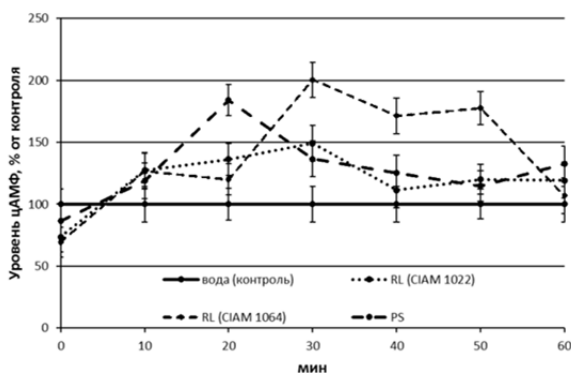


Рис. 1. Динамика уровня цАМФ в корнях проростков гороха в норме и при взаимодействии с симбиотическими и патогенными бактериями

– уровень NO в вариантах с различными бактериями был ниже по сравнению с контролем (рис. 2). Также следует отметить, что мы наблюдали схожую динамику изменения уровня NO при взаимодействии с патогеном и неэффективным штаммом клубеньковых бактерий, которая проявлялась в ритмичных изменениях интенсивности флуоресценции оксида азота на протяжении всего эксперимента. В

свою очередь динамика уровня NO при инокуляции эффективным штаммом ризобий отличалась от двух предыдущих вариантов тем, что в первые 30 мин существенных отличий в уровне NO по сравнению с контролем мы не наблюдали, затем в период с 30 до 50 мин наблюдалось увеличение уровня NO с пиком, приходящимся на 40 мин (увеличение при этом составило 24 % по сравнению с контролем).

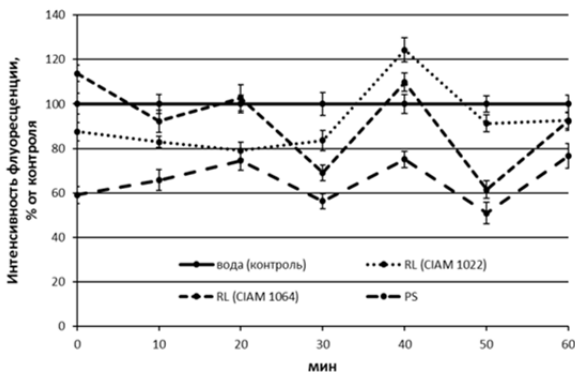


Рис. 2. Влияние симбиотических и патогенных бактерий на интенсивность флуоресценции NO в корнях проростков гороха

Таким образом, по результатам исследований можно отметить следующие закономерности:

1. Под воздействием *Rhizobium leguminisarum* bv. *viciae* (симбионт) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (патоген) обнаружен эндогенный ритм изменения содержания цАМФ и NO в тканях корня проростков гороха.

2. Предполагается, что изменение соответствующих компонентов сигнальных систем (NO, цАМФ) может быть использовано растением-хозяином в качестве «кода» для передачи сигнала о природе действующего фактора и индукции соответствующих реакций на молекулярном уровне.

Литература

- Глянько А. К. Защитные системы бобового растения при инфицировании ризобиями // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2016. Вип. 1 (37). С. 63–77
- Ломоватская Л. А., Кузакова О. В., Романенко А. С., Гончарова А. М. Активность аденилатциклаза и изменение концентрации цАМФ в клетках корня проростков гороха при инфицировании мутуалистами и патогенами. // Физиология растений. 2018. Т. 65, № 3. С. 310–320.

О ВОЗМОЖНОСТИ КОНКУРЕНЦИИ МЕЖДУ ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* И МИКОРИЗНЫМИ ГРИБАМИ

З. М. Курамшина¹, Р. М. Хайруллин², Л. Р. Саттарова¹

¹Стерлитамакский филиал ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Стерлитамак, e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа,
e-mail: krm62@mail.ru

Исследования эндофитных бактерий, выделенных из разных видов растений, свидетельствуют о тесной взаимосвязи хозяина с микроорганизмами, что может быть признаком коэволюции эндофитов и растений [Sicua et al., 2015]. Активно занимая свою нишу, эндофитные бактерии синтезируют различные вещества, способствующие росту растений, устойчивости к фитопатогенам и абиотическим стресс-факторам [Xie et al., 2014]. Несомненно, эндофиты сами используют много различных механизмов, чтобы адаптироваться к среде обитания внутри растений, тем самым влияя на физиологические и биохимические показатели организма хозяина и действуя, также, на другие микроорганизмы, живущие внутри растений и в ризосфере. В настоящее время мало сведений о влиянии эндофитных бактерий на почвенные и ризосферные микроорганизмы, симбиоз растений с арбускулярными микоризными грибами.

Целью работы явилось изучение влияния инокуляции семян эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* штамма 26Д на микоризацию сельскохозяйственных растений. Опыты проводили в лабораторных условиях. Часть семян обрабатывалась бактериями *B. subtilis* 26Д, остальная часть семян обрабатывалась дистиллированной водой и служила контролем. Семена обрабатывали суспензией бацилл из расчета на 1 г семян 20 мкл клеток бактерий, выдерживали в течение часа, затем высаживали в почву. В качестве субстрата для выращивания растений использовали чернозем выщелоченный. Предварительно из него удаляли посторонние включения, корни растений, разрушали крупные комки. Воздушно-сухую почву загружали в пластиковые сосуды. Для этого вначале насыпали часть почвы и раскладывали семена, затем засыпали остатком почвы слоем 1–1,5 см. Затем почву поливали из расчета достижения 70 % от полной полевой влагоемкости. Растения выращивали при освещении люминесцентными лампами (12 кЛк) и 16-часовом фотопериоде. По пришествию двух месяцев растения аккуратно вынимали, стараясь не

повредить побеги и корни. Гистохимический анализ и количественный учет микоризы в корнях проводили по методу Trouvelot (1986). Корни растений отделяли от побегов, промывали под проточной водой, затем дистиллированной водой, осветляли в растворе 10%-ного КОН на водяной бане, далее 3 раза промывали водой, подкисляли 2%-ным раствором HCl в течение 20 мин и окрашивали трепановым синим, растворенным в среде: вода, глицерин, молочная кислота в соотношении 1:1:1 по объему. Из образца корней на двух предметных стекла вырезали по 15 фрагментов длиной 1 см. Эти фрагменты рассматривали под микроскопом «Микмед-2». Колонизацию микоризой оценивали в соответствии с классами, далее результаты обрабатывали при помощи компьютерной программы Mucoscalc [Trouvelot et al., 1986].

При обработке семян бактериями частота микоризации у растений пшеницы уменьшалась на 17,5 %, у ячменя – на 0,4 % (табл.). Интенсивность микоризации корней и фрагмента, а также число арбускул в корневой системе растений пшеницы и ячменя были минимальными в сравнении с контрольным вариантом.

Уменьшение показателей микоризации корней растений было связано, вероятно, с антагонистической активностью этих бактерий не только к различным видам фитопатогенных грибов [Хайруллин и др., 2009], но и к микоризообразующим.

Таблица

Показатели микоризации растений при обработке семян эндофитом

Вариант	Пшеница	Ячмень
Частота микоризации корневой системы, F %		
Контроль	100,0±0,2	100,0±0,1
<i>B. subtilis</i> 26Д	82,5±1,09*	99,6±0,1
Интенсивность колонизации корневой системы микоризой, М %		
Контроль	20,46±1,1	28,19±1,4
<i>B. subtilis</i> 26Д	1,73±0,12	11,79±0,87
Интенсивность колонизации корневого фрагмента микоризой, m %		
Контроль	20,40±1,26	28,19±1,4
<i>B. subtilis</i> 26Д	2,05±0,13	11,85±0,89
Обилие арбускул в корневой системе, А %		
Контроль	11,66±1,01	1,84±0,16
<i>B. subtilis</i> 26Д	0,08±0,04*	0,65±0,18*
Обилие арбускул в корневом фрагменте, а %		
Контроль	42,88±3,1	6,35±0,41
<i>B. subtilis</i> 26Д	1,17±0,08	4,33±0,29

*Различия между показателями растений, обработанных и необработанных препаратами, достоверны при $p \leq 0,05$.

Однако конкуренция между эндофитными штаммами бактерий *B. subtilis* и микоризообразующими грибами, возможно, не наносит вреда растению, так как данные бактерии способны к мобилизации нерастворимых фосфатов [Егоршина и др., 2011], аналогично способности микоризы улучшать обеспечение растений фосфором. Таким образом, способность бактерий *B. subtilis* к мобилизации фосфатов может быть одним из факторов конкуренции с микоризными грибами и механизмом, способствующим «приживанию» бактерий в организме растений благодаря улучшению минерального питания макроорганизма.

Литература

Sicuiu O. A., Petruța C. C. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection // Romanian Biotechnological Letters. 2015. Vol. 20 (5). P. 10737–10750.

Xie S. S., Wu H. J., Zang H. Y., Wu L. M., Zhu Q. Q., Gao X. W. Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105 // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. Vol. 27. P. 655–663.

Trouvelot A., Kough N., Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle // Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae / eds. V. Gianinazzi-Pearson, Gianinazzi S. Paris : INRA Press, 1986. P. 217–221.

Хайруллин Р. М., Минина Т. С., Иргалина Р. Ш., Загребин И. А., Уразбахтина Н. А. Эффективность новых эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* в повышении устойчивости пшеницы к болезням // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 2. С. 133–137.

Егоршина, А. А. Хайруллин Р. М., Лукьянцев М. А., Курамшина З. М., Смирнова Ю. В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы /// Журнал Сибирского федерального университета. Сер. Биология. 2011. № 2. С. 172–182

ЧИСЛЕННОСТЬ ЭПИФИТНОЙ МИКРОБИОТЫ ЗВЕЗДЧАТКИ СРЕДНЕЙ (*STELLARIA MEDIA L.*)

Е. З. Лапкина^{1,2}, Л. С. Тирранен²

¹ Красноярский государственный медицинский университет им. профессора
В. Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск, e-mail: e.z.lapkina@mail.ru

² Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
СО РАН», г. Красноярск, e-mail: tiran@ibp.ru

Изучение обсемененности космополитных и лекарственных растений является актуальным вопросом экологии, поскольку является показателем микробиологического мониторинга автотрофного яруса трофической структуры урбанизированной экосистемы г. Красноярска и обеспечивает понимание закономерностей функционирования эпифитных микроорганизмов в условиях усиления антропогенной нагрузки. Динамику численности и особенности состава микробиоты растений урбанизированной экосистемы можно изучить на широко распространенных видах растений г. Красноярска, одним из которых является звездчатка средняя (*Stellaria media L.*). Настоящая работа посвящена изучению прикорневой микробиоты и микрофлоры надземной части растений, что может расширить представление о роли микроорганизмов в функционировании урбанизированной экосистемы.

Цель исследования: определить динамику численности прикорневой микробиоты и филосферы звездчатки средней (*Stellaria media L.*) в зависимости от вегетационного периода.

Объектом исследования являлась звездчатка средняя (*Stellaria media L.*), произрастающая в лесном массиве микрорайона Академгородок г. Красноярска.

Микробиоту почвы и прикорневой микробиоты и филосферы растений звездчатки средней (*Stellaria media L.*) исследовали методом посева в чашки Петри на элективные питательные среды. Забор проб осуществляли в фазы проростков, цветения и плодоношения растений. Для учёта общего количества аэробных бактерий, усваивающих органический азот, использовали пептонный агар (ПА), бактерий, усваивающие минеральные формы азота – крахмалоаммиачный агар (КАА). Чашки после посева помещали в термостат при температуре 28 °С. Бактерии группы кишечной палочки (БГКП) учитывали на среде Эндо. Чашки после посева помещали в термостат при температуре 37 °С. Микроскопические грибы учитывали на среде сусло грибное с антибиотиками (стрептомицин и пенициллин).

Рост микроорганизмов происходил при комнатной температуре. На 3–4-е сут. проводили учет микроорганизмов. Результаты исследований обработаны статистически по Лакину (1990), используя критерий Стьюдента [Нетрусов и др., 2005]. Обработку данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office.

Почва опытного участка лесного массива Академгородка г. Красноярска представлена в равной степени бактериями, использующие минеральные формы азота и аммонифицирующими бактериями (47–49 %). Среди них встречаются бактерии группы кишечной палочки – 0,35 %, бактерии в стадии спор – 0,79 %. Микроскопические грибы занимают менее 3 %. Полученные данные свидетельствуют о достаточном количестве доступных форм азота для питания микроорганизмов и соотносится с уровнем аммонификации в почве.

Экспериментальные данные по динамике численности прикорневой микробиоты звездчатки средней свидетельствуют о большей численности микроорганизмов в фазу цветения, что, по всей видимости, связано с увеличением синтеза корневых выделений в этот период, а в фазу плодоношения бактерии, использующие продукты экзосмоса растений, сменяются на микроорганизмы, разлагающих листовую отпад, корешки, микробную биомассу (табл.).

Таблица

Численность эколого-трофических групп микроорганизмов микробиоты прикорневой зоны и филлосферы звездчатки средней

Эколого-трофическая группа микроорганизмов	Фаза проростков		Фаза цветения		Фаза плодоношения	
	Прикорневая микробиота	Филлосфера	Прикорневая микробиота	Филлосфера	Прикорневая микробиота	Филлосфера
Общее количество аэробных бактерий	$6,34 \cdot 10^4 \pm 0,12$	$2,53 \cdot 10^4 \pm 0,22$	$7,64 \cdot 10^4 \pm 0,10$	$0,95 \cdot 10^4 \pm 3,46$	$1,73 \cdot 10^4 \pm 0,51$	$6,63 \cdot 10^4 \pm 0,41$
Бактерии, усваивающие минеральные формы азота	$3,61 \cdot 10^4 \pm 0,59$	$3,32 \cdot 10^4 \pm 0,25$	$8,24 \cdot 10^4 \pm 0,13$	$0,45 \cdot 10^4 \pm 0,09$	$1,52 \cdot 10^4 \pm 0,12$	$2,75 \cdot 10^4 \pm 0,37$
Бактерии группы кишечной палочки	$1,21 \cdot 10^2 \pm 0,41$	$0,11 \cdot 10^2 \pm 0,01$	$2,65 \cdot 10^2 \pm 0,18$	$0,08 \cdot 10^2 \pm 0,01$	$0,60 \cdot 10^2 \pm 0,02$	$0,23 \cdot 10^2 \pm 0,02$
Споровые бактерии в стадии спор	$0,88 \cdot 10^2 \pm 0,29$	0	$1,47 \cdot 10^2 \pm 0,04$	$0,07 \cdot 10^2 \pm 0,01$	$0,18 \cdot 10^2 \pm 0,04$	$0,01 \cdot 10^2 \pm 0,01$
Микроскопические грибы	$1,23 \cdot 10^2 \pm 0,20$	$5,28 \cdot 10^2 \pm 0,28$	$10,85 \cdot 10^2 \pm 0,29$	$17,87 \cdot 10^2 \pm 0,20$	$1,80 \cdot 10^2 \pm 0,57$	$7,46 \cdot 10^2 \pm 0,20$

Общее количество аэробных бактерий филлосферы увеличивается в 2,6 раза в фазу плодоношения по сравнению с фазой проростков, что, вероятно, связано с повышенным продуцированием метаболитов растениями в этот период. На этот факт указывает и соотношение общего количества аэробных бактерий ($6,63 \cdot 10^4$ КОЕ/г сухой массы) к численности бактерий, усваивающих минеральные формы азота ($2,75 \cdot 10^4$ КОЕ/г сухой массы). Содержание бактерий группы кишечной палочки незначительное (до $0,24 \cdot 10^2$ КОЕ/г сухой массы), вероятно, метаболиты растений звездчатки средней способны проявлять бактериостатические свойства, поэтому можно считать надземную часть растений незагрязненной биологически. Микроскопические грибы представлены родами: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Mukor*, *Aspergillus*, *Cladosporium*.

Таким образом, получены данные динамики численности эколого-трофических групп прикорневой микробиоты и филлосферы звездчатки средней в фазы проростков цветения и плодоношения.

Литература

Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов [и др.] ; под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.

АУТЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КО-АДАПТАЦИИ ВКЭ И ПОЗВОНОЧНЫХ ХОЗЯЕВ – ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОД

Н. А. Ляпунова, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека,
г. Иркутск, e-mail: nataly2193@mail.ru

Среди инфекционных болезней есть группа опасных для человека вирусных инфекций, которые передаются человеку при укусах членистоногих – комаров, клещей, блох и др. Среди них такие тяжелые заболевания как лихорадка Денге, желтая лихорадка, японский энцефалит, лихорадка Зика, клещевой энцефалит (КЭ), Крымская-Конго лихорадка, лихорадка Западного Нила, лихорадка чикугунья и др. Естественными хозяевами и резервуарами таких инфекций в большинстве случаев являются мелкие млекопитающие и грызуны. Чтобы понять эпидемический процесс трансмиссивных вирусных инфекций, необходимо изучить механизмы циркуляции вирусов в природе. Выяснение характера этих механизмов послужит основой для разработки новых стратегий прогноза и контроля инфекций. Од-

ной из наиболее опасных и широко распространенных природно-очаговых болезней в Российской Федерации остается КЭ. Возбудителем заболевания является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который относится к семейству *Flaviviridae* и передается человеку при укусах иксодовых клещей. В Российской Федерации ВКЭ вызывает до 10 тысяч случаев заболевания человека ежегодно. В. И. Злобин (2010) установил, что на рубеже XX и XXI вв. в РФ зафиксирован исторический максимум заболеваемости. Рост заболеваемости обеспечивался, главным образом, за счет регионов Урала и Сибири. В регионах Восточной Сибири отмечен чрезвычайно высокий темп роста заболеваемости: например, только за пять лет (1994–1999 гг.) в Республике Хакасия она выросла в 4 раза, в Республике Бурятия – в 5 раз, в Иркутской обл. в 6 раз, в Республике Тыва – в 16. Уровень заболеваемости в дальневосточном регионе не превышал среднероссийского, однако здесь регистрировали наиболее клинически тяжелый КЭ и отмечали наивысшую летальность. Начиная с 2000 г. в РФ фиксируется спад заболеваемости, отражающий цикличность эпидемического процесса при КЭ, однако в 2007–2008 гг. отмечена тенденция роста заболеваемости в ряде европейских регионов [Злобин В. И., 2010]. А. В. Никитин и др. (2016) проанализировали эпидемиологическую ситуацию по клещевому вирусному энцефалиту на территории России в 2015 г. Было показано, что число случаев присасывания клещей к людям в большинстве субъектов страны выросло по сравнению со средними многолетними показателями [Никитин А. В., 2016]. Высокая эпидемическая значимость ВКЭ обуславливает актуальность изучения процессов его циркуляции в природных очагах инфекций. Помимо этого, ВКЭ является репрезентативной моделью для изучения других флавивирусных инфекций.

Экологическая ко-адаптация ВКЭ и резервуарных хозяев настолько сильна, что инфекция в организме естественного хозяина, как правило, протекает без клинических проявлений и не приводит к ослаблению или гибели животного [Tonteri, 2013]. За счет этого вирус способен циркулировать в популяции компетентных животных длительное время [Tonteri, 2011]. Однако, попадая в организм неадаптированных животных, в том числе и человека, вирус вызывает тяжелое заболевание и, во многих случаях, гибель больного. В настоящее время до конца не выяснено, за счет каких биологических механизмов обеспечивается устойчивость резервуарных хозяев к вирусной инфекции. Для раскрытия этих механизмов необходимо исследовать взаимодействие вируса и хозяина на клеточном и моле-

кулярном уровне. Проведение подобных исследований требует адекватных лабораторных моделей, прежде всего перевиваемых клеточных линий, которые являются одним из наиболее эффективных инструментов современной вирусологии.

В последние годы, в качестве наиболее перспективного пути решения этой проблемы рассматривается создание новых модельных систем на основе естественных хозяев инфекций [Eckerle, 2014; Mourya, 2013]. Однако разнообразие, доступность и степень изученности таких моделей еще очень невелики. Поэтому для изучения взаимодействия ВКЭ с организмом естественного хозяина была создана перевиваемая культура клеток почки восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae*, которая является одним из основных прокормителей иксодовых клещей и резервуарным хозяином для многих трансмиссивных инфекций, в том числе и для ВКЭ.

Цель данной работы – изучить динамику репликации РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в новой перевиваемой линии клеток почки восточноазиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae* (ArpK) и сравнить ее с репликацией в традиционной культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ).

Перевиваемая линия клеток ArpK получена в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск), идентичность культуры установлена с помощью анализа нуклеотидной последовательности митохондриального гена цитохрома В (mtCytB, номер доступа GenBank KT983422) и последовательности D-петли митохондриального генома (d-loop, KT983423). Клетки заражали штаммом ВКЭ сибирского субтипа 92М и выделяли из них суммарную РНК через 0; 4; 8; 16 и 24 ч после заражения. Кроме того, РНК выделяли также через 1; 4; 7 и 19 дней после заражения. Количество внутриклеточной РНК ВКЭ положительной полярности (+РНК) оценивали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени.

На начальном этапе инфицирования (0 ч после заражения) в клетках ArpK концентрация внутриклеточной +РНК была существенно ниже, чем в клетках СПЭВ – 4,5 lg против 5,5 lg геном-эквивалентов/мкл ($p = 0,01$). Через 8 ч в клетках ArpK достоверных различий с точками 0 и 4 выявлено не было ($p = 0,5$ и $p = 0,1$ соответственно), тогда как клетках СПЭВ на этой стадии концентрация РНК была существенно выше, чем в точках 0 и 4 ($p = 0,001$ и $p = 0,01$ соответственно). В целом, в течение первых суток инфекции, концентрация +РНК в клетках ArpK была почти в 10 раз ниже, чем в

клетках СПЭВ ($p = 0,001$). К четвертому дню после заражения в клетках АрпК отмечены максимальные концентрации +РНК- 7,8 lg геном-эквивалентов/мкл – причем различий с клетками СПЭВ не наблюдалось ($p = 0,06$). В дальнейшем количество РНК в клетках АрпК оставалось на том же уровне в течение 19 дней, а в клетках СПЭВ на поздних сроках отмечалась тенденция к снижению концентрации +РНК.

Полученные результаты позволяют предположить, что у *A. peninsulae* ВКЭ существует внутриклеточный механизм контроля вирусной инфекции, действующий как на стадии входа вириона в клетку, так и за счет регуляции скорости синтеза геномной и/или репликативных форм вирусной РНК.

Литература

Злобин В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики // Инфекционные болезни. 2010. № 2. С. 13–21.

Никитин А. В. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в российской федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. С. 40–43.

Eckerle I., Lenk M., Ulrich R. G. More novel hantaviruses and diversifying reservoir hosts--time for development of reservoir-derived cell culture models? // Viruses. 2014. Vol. 6. P. 951–67.

Tonteri E, Jääskeläinen A, Tikkakoski T, et al. Tick-borne Encephalitis Virus in Wild Rodents in Winter, Finland, 2008–2009 // Emerg Infect Dis. 2011. Vol. 17, N 1. P. 72–75.

Tonteri E, Kipar A, Voutilainen L, Vene S, Vaheri A, Vapalahti O, Lundkvist Å. The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*) // PLoS One. 2013 Dec 13; 8(12):e81214.

Mourya D. T., Lakra R. J., Yadav P. D., Tyagi P., Raut C. G., Shete A. M. et al. Establishment of cell line from embryonic tissue of *Pipistrellus ceylonicus* bat species from India & its susceptibility to different viruses // Indian J Med Res. 2013. Vol. 138. P. 224–231.

ВЛИЯНИЕ ФТАЛАТОВ НА КОЛОНИЗАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ФИТОПАТОГЕНА *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS*

Л. А. Максимова, Т. Н. Шафикова,
А. Г. Еникеев, А. А. Семёнов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: VendyS@yandex.ru

Фталаты (сложные эфиры *о*-фталевой кислоты) наиболее известны как продукты химической промышленности, и долгое время считались исключительно ксенобиотиками и поллютантами. Однако к настоящему моменту появилось немало сведений о присутствии

биогенных фталатов в организмах различных таксономических групп. настоящему времени получены прямые доказательства биосинтеза фталатов из меченых предшественников [Babu, 2010]. В проведенных нами исследованиях, фталаты были обнаружены в растениях, взятых из естественной среды обитания, а также в закрытых экспериментальных системах с контролируемыми условиями роста – в растениях и культурах клеток, выращиваемых *in vitro* [Семенов и др., 2016; Enikeev et al., 2019]. Следует отметить, что растения *in situ* были разных таксономических групп, разных экологических специализаций и произрастали в разных регионах России. Кроме того, была установлена способность клеток в условиях стресса экскретировать фталаты во внеклеточную среду, что также может иметь биологическое значение при взаимодействии различных организмов [Babu, 2010]. Вместе с тем появились экспериментальные данные об участии фталатов в подавлении роста симбионтов растений *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* [Макарова, 2012]. Эти факты дают основание предполагать использование растениями этих веществ в качестве защитных соединений. Одной из стратегий преодоления механизмов защиты растения и начальным этапом его колонизации бактериями является образование биопленок – сложных структурированных сообществ микроорганизмов, погруженных в полисахаридный матрикс. Надо отметить, что ранее влияние фталатов на фитопатогенные бактерии практически не изучалось.

Добавление ДБФ в среду культивирования бактерий снижало интенсивность биопленкообразования у биотрофа *Cms*. Важно отметить тот факт, что при этом наблюдалось усиление роста бактериальных культур. Аналогичным был эффект при использовании ДЭГФ. Его действие также приводило к снижению интенсивности биопленкообразования и также стимулировала рост культур изучаемых фитопатогенов, хотя и в различной степени. На основании полученных данных можно полагать, что фталаты принимают участие в защите растений от инфекций, подавляя процесс биопленкообразования бактериальных фитопатогенов – начальный этап колонизации растений.

Между тем, фталаты были обнаружены в клетках бактерий фитопатогенов [Шафикова и др., 2019]. При выращивании *Cms* в чашках Петри на полной среде с концентрацией ДБФ 10, 20, 30 и 60 мкМ наблюдалось временное ингибирование роста колоний на фоне присутствия в среде 60 мкМ ДБФ. Через 3 сут. рост возобновлялся. При выращивании *Cms* в чашках Петри на минимальной среде с гра-

диентом ДБФ 0–60 мкг/л наблюдался рост бактерий в направлении увеличения концентрации ДБФ, что свидетельствует о наличии физиологической реакции бактерий на присутствие фталатов. Стимулирование пролиферации в клетках печени крыс [Buckner, 2018] экзогенным ди-N-октилфталатом и активация роста Cms в среде с 10–30 мкМ ДБФ, возможно, имеют аналогичный механизм возникновения.

Таким образом, на сегодняшний день обнаружены эндогенные фталаты у растений *in situ* и впервые *in vitro*, а также у бактерий; в модельных экспериментах выявлено подавление фталатами формирования биопленок бактериального фитопатогена *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* на фоне стимуляции роста патогенов при концентрации дибутилфталата в среде в диапазоне 10–30 мкМ. При концентрации свыше 60 мкМ наблюдалось бактериостатическое действие ДБФ. Предполагалось, что фталаты имеют функциональное значение и прежде всего участвуют в защитных реакциях растений на воздействие фитопатогенов. Однако весьма неоднозначные результаты говорят о том, что физиолого-биохимическая роль фталатов может оказаться гораздо более сложной, и не ограничиваться только участием в защитном процессе растительных организмов.

Литература

Babu B., Wu J. -T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria // Science of The Total Environment. 2010. Vol. 408, N 21. P. 4969–4975.

Семенов А. А., Еникеев А. Г., Снеткова Л. В., Пермяков А. В., Соколова Н. А., Дударева Л. В. Сложные эфиры ортофталевой кислоты из культуры *Aconitum baicalense* Turcz ex Rapaics 1907 // Доклады Академии наук. 2016. Т. 471, № 3. С. 366–367.

Enikeev A. G., Semenov A. A., Permyakov A. V., Sokolova N. A., Gamburg K. Z., Dudareva L. V. Biosynthesis of ortho-phthalic acid in the plant and cell cultures // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. Vol. 55, N. 3

Buckner S. L., Pruitt A. N., Thomas C. N., Amin M. Y., Miller L. L., Wiley F. E., Sabbatini M. E. Di-N-octylphthalate acts as a proliferative agent in murine cell hepatocytes by regulating the levels of TGF- β and pro-apoptotic proteins // Food and Chemical Toxicology. 2018. Vol. 111. P. 166–175

Шафикова Т. Н., Омеличкина Ю. В., Бояркина С. В., Еникеев А. Г., Максимова Л. А., Семенов А. А. Обнаружение эндогенных фталатов у бактериальных патогенов растений и животных // Докл. Акад. наук. 2019. Т. 484, № 1.

Макарова Л. Е., Смирнов В. И., Клыба Л. В., Петрова И. Г., Дударева Л. В. Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобийного симбиоза // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48, № 3. С. 394–402.

ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ *COXIELLA BURNETII*

Ю. А. Панферова, О. А. Фрейлихман, А. Н. Ваганова,
Н. К. Токаревич

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
г. Санкт-Петербург, e-mail: zoonoses@mail.ru

Внутриклеточный патоген *Coxiella burnetii* относится к представителям порядка Legionellales филы Gammaproteobacteria. В реализации патогенетического потенциала данного микроорганизма участвует широкий спектр липополисахаридов и белков, некоторые из которых относят к потенциальным факторам вирулентности. В то же время хорошо изучены из них лишь липополисахариды, участвующие в феномене фазовой вариации (аттенуации микроба). В настоящее время на основании геномных и протеомных исследований выделено несколько классов белков, которые, как полагают, являются факторами вирулентности и участвуют в модуляции функций клетки хозяина [Панферова, 2012]. Учитывая существование нескольких геномогрупп с различной степенью патогенности для теплокровных хозяев [Beage, 2006], интересным представляется оценка полиморфизма генов класса *enhX* («enhanced entry proteins»), гомологичных генам *L. pneumophila*, продукты которых участвуют в процессе инвазии в клетку хозяина.

EnhA.1 является белком семейства YkuD-доменсодержащих белков и связан, помимо прочего, с ремодуляцией клеточной стенки. Все белки данного семейства обладают L,D-транспептидазной каталитической активностью. Различные филогенетические группы микроорганизмов содержат в геноме разное число генов данного семейства. У *C. burnetii* значимое повышение экспрессии гена (Cbu0619), кодирующего данный белок, наблюдается при переходе из малой клеточной формы в большую клеточную форму [Sandoz, 2016].

EnhC связан с функциями растворимой муреин-трансгликозилазы, белка, отвечающего за расщепление N-ацетилмурамовой кислоты, что необходимо для роста клеточной стенки. У *L. pneumophila* белок связан с активацией роста клетки, функции его гомолога у *C. burnetii* пока остаются малоизученными. Показано, что он участвует во внедрении патогенов в клетку хозяина, в реализацию вирулентных свойств в моделях *in vivo* [Cirillo, 2000; van Schaik, 2017]. Белок EnhC *C. burnetii* (Cbu0874) содержит тетратрикопептидные повторы

и, по-видимому, играет функции адапторных белков сигнальных комплексов [Панферова, 2012].

Таким образом, указанные белки могут участвовать в реализации вирулентных свойств патогена, и полиморфизмы кодирующих их генов могут быть связаны с патоадаптацией того или иного штамма, что проявляется в разной степени его вирулентности. Целью настоящей работы было изучение генетических полиморфизмов у штаммов, обладающих разной степенью вирулентности в моделях на лабораторных животных либо различающихся по форме заболевания у людей, как потенциальных факторов вирулентности.

Были проанализированы штаммы из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (4 штамма), а также последовательности штаммов, подходящих под вышеуказанные критерии отбора, задепонированные в базе данных GenBank NCBI. Множественное выравнивание производилось по алгоритму ClustalW с помощью пакета программ Ugene 1.31.0.

При исследовании последовательностей гена *enhA1* были выявлены полиморфизмы, характерные для штаммов так называемой «хронической группы» (выделены от пациентов с хронизацией коксиеллезной инфекции либо от животных). Данная группа включала штаммы Scurry_Q217, G_Q212, MSU_goat177, Namibia. Для штамма MSU_goat177 характерно наличие делеций 292del, 495del. Для штаммов Scurry_Q217 и G_Q212 характерно наличие SNP 411G>A. У штаммов MSU_goat177 и Namibia наблюдался SNP 479G>A. Для всей «хронической» группы и слабовирулентного штамма Dugway было характерно присутствие SNP 604T>C, а для последнего – также уникальный SNP 565G>A. Штаммы, выделенные на территории России, кластрировались вместе с европейскими штаммами, причем дифференциации по типу хозяина не наблюдалось.

Последовательность гена *enhC* оказалась более изменчивой, причем четкой кластеризации, как в случае *enhA1*, не наблюдалось. Было выявлено большое число уникальных полиморфизмов, характерных для одного либо двух штаммов. Для указанной выше «хронической» группы штаммов был характерен лишь SNP 2696T>C. В то же время два штамма «хронической» группы (MSU_goat177, Namibia) кластрировались вместе со слабовирулентным штаммом Dugway по полиморфным сайтам 115A>G, 1396G>C, 1414T>G, 2121C>T, 2222A>G, 2896C>T, что может указывать на отбор даже внутри группы изолятов с близкими свойствами. Для слабовирулентного штамма Dugway были характерны сайты 25del, 26A>G.

Наблюдались полиморфизмы, ассоциированные преимущественно с географическим источником штамма: так, у всех американских и африканского штамма обнаружена замена 2216T>G, у ряда европейских – 2008C>T. Интересно, что у выборки штаммов, выделенных во время крупнейшей вспышки коксиеллеза в Европе в 2007–2010 гг. наблюдались уникальные полиморфизмы 370G>T, 678G>A, 820T>C. Вероятно, они могут быть связаны с распространением более вирулентного клона в течение последнего десятилетия в странах Европы.

При исследовании генов, кодирующих потенциальные факторы вирулентности, было установлено, что для гена, кодирующего белок EnhA1 *C. burnetii* характерно наличие полиморфных сайтов, которые могут быть связаны с его функциональными свойствами, что выражено в кластеризации изолятов на «острую» и «хроническую» группу. В то же время, для гена, кодирующего белок EnhC подобная зависимость слабо выражена, присутствует много SNP, характерных лишь для одного штамма либо для группы, объединяемой по признаку географического источника. Весьма специфические полиморфизмы характерны для последовательностей обоих генов слабовирулентного штамма Dugway. Более детальный анализ, учитывающий более широкий спектр белков класса «enhanced entry proteins» и их структуру белков у различных штаммов позволит установить роль этих факторов в патоадаптации изолятов.

Литература

- Панферова Ю. А. Молекулярно-генетические основы физиологии и патогенности *Coxiella burnetii* // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 615–626.
- Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons // J Bacteriology. 2006. Vol. 188. P. 2309–24.
- Cirillo SL, Lum J, Cirillo JD. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila* // Microbiology. 2000. Vol. 146, Pt 6. P. 1345–59.
- Sandoz KM, Popham DL, Beare PA, Sturdevant DE, Hansen B, Nair V, Heinzen RA. Transcriptional Profiling of *Coxiella burnetii* Reveals Extensive Cell Wall Remodeling in the Small Cell Variant Developmental Form // PLoS One. 2016. Vol. 11. P. e0149957.
- van Schaik EJ, Case ED, Martinez E, Bonazzi M, Samuel JE. The SCID Mouse Model for Identifying Virulence Determinants in *Coxiella burnetii* // Frontiers Cell Infectious Microbiology. 2017. Vol. 7. P. 25.

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* И *FUSARIUM CULMORUM*, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ РИЗОСФЕРУ ЯЧМЕНЯ

А. И. Шапошников¹, Н. А. Вишневская¹,
В. Ю. Шахназарова^{1,2}, О. К. Струнникова¹

¹ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии,
г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, e-mail: ai-shaposhnikov@mail.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет,
г. Санкт-Петербург, e-mail: shahnazarova-v@mail.ru

Механизмы подавления фитопатогенных грибов ризобактериями довольно хорошо изучены – это конкуренция за питание, продукция антибиотических веществ, сидерофоров и литических ферментов [Raaijmakers et al., 2006; Weller et al., 2007; Lugtenberg and Kamilova, 2009; Compant et al., 2010]. Однако практически ничего не известно о роли растения в регуляции взаимоотношений между фитопатогеном и антагонистом, особенно на самых ранних этапах формирования растительно-микробной системы, в период, когда гриб и бактерия колонизируют корни. Целью данной работы являлось изучение в модельных условиях особенностей колонизации корней ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Белогорский) антагонистическими бактериями *Pseudomonas fluorescens* SPB2137 и фитопатогенным грибом *Fusarium culmorum* 30 в условиях, приводящих к разной заболеваемости растений.

Учитывая, что конкуренция за питание является основным механизмом, определяющим адаптационный потенциал микроорганизмов в ризосфере растений, в проведенных экспериментах были смоделированы условия, различающиеся по уровню минерального питания (растения, инокулированные микроорганизмами, выращивали либо в деионизированной воде, либо в минеральном растворе), что, в конечном итоге, привело к разной заболеваемости ячменя фузариозной корневой гнилью. В этих условиях изучили влияние *P. fluorescens* и *F. culmorum* на растение и ответные реакции растения на колонизацию микроорганизмами. Взаимное влияние оценивали по количеству гриба и бактерий на корнях, уровню болезни, а также по количественному составу сахаров, органических кислот и аминокислот в корневых экссудатах.

Гриб и бактерии утилизировали, в основном, одинаковый набор веществ, выделяемых корнями ячменя, однако, были выявлены и их трофические предпочтения. Из всех сахаров, содержащихся в корне-

вых экссудатах, гриб и бактерии предпочитали глюкозу, но гриб утилизировал глюкозу активнее, чем бактерии. Органические кислоты и аминокислоты, напротив, активнее потреблялись бактериями, нежели грибом. Штамм *P. fluorescens* SPB2137 утилизировал значительно больший, чем *F. culmorum*, набор органических кислот и аминокислот, что свидетельствует о его высокой конкурентоспособности за данные компоненты корневых экссудатов и хорошей способности адаптироваться к условиям ризосферы растений, различающихся по составу корневых экссудатов. Было установлено, что корневые экссудаты, являясь единственным источником питания, приводят к конкурентным взаимоотношениям между *F. culmorum* и *P. fluorescens*, при этом не только бактерии подавляли рост гриба, но и гриб был способен снижать численность бактерий.

В условиях недостатка минерального питания корневая экссудация растений ячменя была намного интенсивнее, чем при полном минеральном питании: растения выделяли в 3. 7 раза больше органических кислот, в 8. 2 и в 30 раз больше сахаров и аминокислот, соответственно. При этом в условиях недостатка минерального питания заболеваемость растений, вызываемая *F. culmorum*, была незначительной и составляла 13. 7 %, а в присутствии *P. fluorescens* количество больных растений снижалось до 10 %. В условиях полного минерального питания заболеваемость ячменя корневой гнилью была значительной (70 %), а присутствие бактерий снижало количество больных растений до 37 %. Можно предположить, что в условиях дефицита минерального питания, когда корневая экссудация значительно интенсивнее, агрессивность фитопатогенного гриба снижена за счет того, что в ризосфере достаточно доступных питательных веществ и факультативный фитопатоген *F. culmorum* не переходит на паразитический тип питания.

Увеличение количества гриба и бактерий на корнях при их совместном внесении в варианте с полным минеральным питанием приводило к существенному снижению количества сахаров (в 50. 2 раз) и органических кислот (в 3. 4 раза), а также к почти полному отсутствию большинства аминокислот в растворе корневых экссудатов. Вполне возможно, что именно дефицит аминокислот в данных условиях является фактором, приводящим к конкуренции за элементы питания между грибом и бактериями в ризосфере ячменя.

Таким образом, корневые экссудаты играют регулируемую роль во взаимоотношениях между факультативным фитопатогеном *F. culmorum* и антагонистическими ризобактериями *P. fluorescens*.

Конкуренция за питательные компоненты корневых экссудатов может быть механизмом, регулирующим численность фитопатогенного гриба и ризобактерий в ризосфере и на корнях растений. При этом интенсивность корневой экссудации может влиять не только на численность конкурирующих микроорганизмов, но и на их адаптационную стратегию во взаимодействии с растением.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-016-00111-а и Государственного задания, тема № АААА-А-18-118031290034-8.

Литература

Compant S., Clement C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. Vol. 42. P. 669–678.

Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria // *Annual Review of Microbiology*. 2009. Vol. 63. P. 541–556.

Raaijmakers J. M., de Bruijn I., de Kock M. J. D. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* species: diversity, activity, biosynthesis and regulation // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006. Vol. 19. P. 699–710.

Weller D. M., Landa B. B., Mavrodi O. V., Schroeder L. K., De la Fuente L., Blouin Bankhead S., Allende Molar R., Bonsall R. F., Mavrodi D. V., Thomashow L. S. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots // *Plant Biology*. 2007. Vol. 9. P. 4–20.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ МОЛЕКУЛ-АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ И НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

К. Ю. Швец¹, Ал. Х. Баймиев²

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа,
e-mail: kseniya.shvets@yandex.ru

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа,
e-mail: baymiev@mail.ru

Инфекционные заболевания, в частности внутрибольничные (нозокомиальные, госпитальные) инфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, на протяжении многих столетий были и остаются наиболее опасными болезнями человеческого организма из-за их способности вовлечь в процесс большое число здоровых людей в течение короткого периода времени. Эта проблема носит междисциплинарный характер в силу особенностей эпидемиологии данных заболеваний, разнообразия их нозологических форм и

клинических проявлений, а также своеобразие этиологии, патогенеза и спектра возбудителей указанной патологии [Kumar, 2009].

Наиболее часто выделяемыми нозокомиальными патогенными микроорганизмами являются *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Примерно 1/10 всех случаев инфекций составляет один из самых опасных оппортунистических патогенов *Pseudomonas aeruginosa*. Реже встречаются микроорганизмы *Candida albicans* и *Klebsiella pneumoniae* [Martin, 2017].

В настоящее время резко снизилось количество эффективных в отношении перечисленных микроорганизмов антибиотиков, что связано в первую очередь с распространением антибиотикорезистентности, вероятно ассоциированной с явлением сцепления генов устойчивости к антибиотикам с другими детерминантами резистентности. В связи с этим поиск новых потенциальных антибиотиков имеет первостепенное значение.

Цель исследования – исследование новых химических соединений, отобранных с помощью репортерной конструкции pDualrep2, на предмет активности в отношении клинически значимых штаммов микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

Материалы и методы. В исследование были включены 166 соединений разнородных по химическому строению и объединенных в 4 группы по механизму действия (действующие по механизму ингибирования биосинтеза белка, по механизму индукции SOS-ответа, сочетающие действие указанных механизмов и с неизвестным механизмом действия). Были использованы следующие тестовые штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* (№ 25922 ATCC), *Klebsiella pneumoniae* (№ 181210171-2), *Pseudomonas aeruginosa* (№ 27853 ATCC), *Staphylococcus aureus* (№ 206 ATCC USA) и *Candida albicans* (№ 181210169-1). Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия). Исследуемые химические соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (конечная концентрация 100 мМ) и закапывали по 1 мкл на поверхность питательной среды с нанесенной культурой микроорганизма. Чашки Петри инкубировали при 37 °C в течение 18–24 ч, затем фотографировали на фотодокументационной системе Gel Doc™ XR + Gel Documentation System (Bio-Rad).

Результаты и обсуждение. Первоначально проводился отбор активных химических соединений с использованием репортерной

системы, разработанной на химическом факультете МГУ имени М. В. Ломоносова Остерманом И. А. и его коллегами. Данная репортерная конструкция pDualrep2 в штамме $\Delta tolC$ *Escherichia coli* верифицирована на большом наборе антибиотиков с известным механизмом действия и позволяет определять антибактериальное действие соединения по механизму ингибирования процесса трансляции, биосинтеза белка, либо по механизму индукции SOS-ответа в ответ на многочисленные повреждения ДНК.

На следующем этапе мы проводили исследование антимикробной активности отобранных химических соединений в отношении условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* с помощью диско-диффузионного метода. Проведённый нами мониторинг чувствительности к антимикробным препаратам перечисленных микроорганизмов позволил констатировать общие тенденции нарастания антибиотикорезистентности изученных патогенов. Все изученные нами штаммы обладали разными антибиотикограммами к традиционным препаратам и значительной вариабельностью к современным антибиотикам с выраженной полирезистентностью у *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Стоит отметить, что 4,8 % химических соединений проявляли активность в отношении всех исследуемых микроорганизмов. Остальные молекулы-антибиотики обладали менее выраженной активностью и действовали только в отношении единичных штаммов микроорганизмов, либо вовсе не проявляли антимикробную активность (10,2 %) в отношении тестируемых штаммов.

При оценке результатов определения чувствительности изученных нами штаммов грамотрицательных бактерий к действию антибиотиков обращает на себя внимание тот факт, что наиболее эффективными в отношении *Escherichia coli* были 46,4 % всех соединений, однако диаметр зон подавления бактериального роста в таком случае не превышал 4 мм. Иная картина наблюдалась при оценке антимикробной активности молекул-антибиотиков в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Наиболее выраженный характер наблюдался при культивировании в присутствии 13 веществ, причем 2 вещества обладали достаточно выраженным бактерицидным действием (зона подавления роста от 16 до 20 мм).

Как было уже указано выше музейный штамм *Klebsiella pneumoniae* проявлял выраженную полирезистентность в отношении исследуемых антибиотиков. Всего активностью обладали 62 соеди-

нения, однако полученная картина была схожа с результатами, полученными для бактерии *Escherichia coli*, и диаметр зоны подавления роста не превышал 4 мм. Аналогичная ситуация наблюдалась и в отношении грибов рода *Candida* spp. В общей сложности лишь 16,9 % из всех соединений проявляли минимальную активность в отношении штамма.

Исследование чувствительности штамма *Staphylococcus aureus* к новым тестируемым антибиотикам показало достаточно высокую эффективность препаратов. Согласно полученным нами данным в отношении данного вида микроорганизма были активны 99 соединений (59,6 %), причем 21 % из этих соединений обладали выраженным действием в отношении штамма (зона подавления роста от 7 до 25 мм).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 17-74-30012) «Новый рациональный подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых лекарственных молекул с применением технологии ВПС».

Литература

Kumar A., Ellis P., Arabi Y., Roberts D., Light B., Parrillo J. E., Dodek P., Wood G., Kumar A., Simon D., Peters C., Ahsan M., Chateau D. Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock // Chest. 2009. Vol. 136, N 5. P. 1237–1248.

Martin E., Sanjay B., Bärbel C., Jürgen G., Peter G. B., Philippe H., Peter H., Carola I., Axel K., Elaine L., Wolfgang M., Martin M., Peter O., Birgit R., Manfred R., Ricarda M. S., Hans-Günther S., Matthias T. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug – resistant Gram – negative bacteria // GMS Hyg Infect Control. 2017. N 12. P. 37–45.

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КАК ОДНА ИЗ ФОРМ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

СОСТАВ И СТРУКТУРА ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЁНОК В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗ. БАЙКАЛ

О. И. Белых, Е. Г. Сороковикова, И. В. Тихонова

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: belykh@lin.irk.ru

Цианобактерии благодаря своим уникальным особенностям, таким как осуществление окислительного фотосинтеза, фиксация молекулярного азота и высокая устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов вследствие морфологических и физиологических свойств, способны колонизировать самые различные экологические ниши, в том числе и экстремальные [Розанов, 2002]. Фотоавтотрофные микроорганизмы, поселяясь первыми на различных субстратах в водоемах и на суше, обеспечивают рост и развитие гетеротрофных бактерий, что приводит к формированию сложных, структурно организованных биопленок, характеризующихся разнообразным видовым составом.

Цель работы – исследование цианобактериальных сообществ, заселяющих различные типы субстратов на дне литоральной зоны озера Байкал, с помощью микроскопических методов и высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК.

Пробы бентосных биопленок с различных субстратов были отобраны в подледный период в феврале-марте в Южном Байкале в 2014–2017 гг. В летне-осенний период пробы отобраны в трех котловинах озера.

Исследованы обрастания, развивающиеся на субстратах как биотического происхождения – больные губки *Lubomirskia baicalensis* и

Baikalospongia sp., погруженные макрофиты, так и абиотических – камни, скальные выходы. На больных губках встречались цианобактериальные обрастания двух типов – в виде красно-фиолетовых пленок и такого же цвета кустиков. Погибшие, полностью обесцвеченные губки содержали небольшое количество цианобактерий внутри тела, выраженные наружные обрастания на них отсутствовали. Микроскопический анализ 96 проб, отобранных с больных губок в разные сезоны года, показал, что наиболее часто (54 % проб) доминирующим видом, формирующим обрастания-пленки, был представитель нового для Байкала рода – *Tychonema* sp., в 7 % проб пленки были образованы *Pseudanabaena galeata*. Кустистые обрастания на губках в большинстве случаев (26 % проб) сформированы новым для Байкала видом рода *Symplocastrum* и реже (8 % проб) – *Tolypothrix distorta*. В теле отмерших губок наиболее часто регистрировали *Synechococcus Cyanobium* spp., *Pseudanabaena galeata* и *Leptolyngbya* sp., а на спикулах – обрастания из *Chamaesiphon fuscus* и *Heteroleibleinia* sp. (4 % проб). В целом, обрастания больных губок характеризовались высоким видовым разнообразием. В их составе идентифицировано 27 видов цианобактерий, принадлежащих четырём порядкам – Synechococcales, Chroococcales, Oscillatoriales и Nostocales.

В обрастаниях погруженных макрофитов наблюдали меньшее видовое разнообразие: в них доминировал тот же вид, что и на губках – *Tychonema* sp. с небольшой примесью *Pseudanabaena galeata* и *Leptolyngbya* sp., также отмечено присутствие *Tolypothrix distorta* и *Gloeotrichia echinulata*.

В обрастаниях каменистых субстратов идентифицировано 25 видов цианобактерий (61 проба). Основными видами являлись *Tolypothrix distorta* (44 % проб), *Tychonema* sp. (22 % проб), *Symplocastrum* sp. (17 % проб), в районе пос. Листвянка в числе доминантов отмечен также вид *Lyngbya aestuarii* (10 % проб). На камнях со слабо выраженными обрастаниями наблюдали тот же доминирующий комплекс видов, что и на погибших губках – *Chamaesiphon* spp. и *Heteroleibleinia kuetzingii* (7 % проб).

Исследование биопленок с использованием сканирующей электронной микроскопии показало, что цианобактерии являются структурной основой биопленок (рис.).

Колонии представителей Nostocales и Oscillatoriales, располагаясь на поверхности субстратов преимущественно кустистыми обрастаниями из слипшихся филаментов, формировали трехмерные структуры, служащие каркасом биопленок. Более мелкие по размеру цианобактерии, гетеротрофные бактерии и диатомовые водоросли локализовались между ними или на их поверхности.

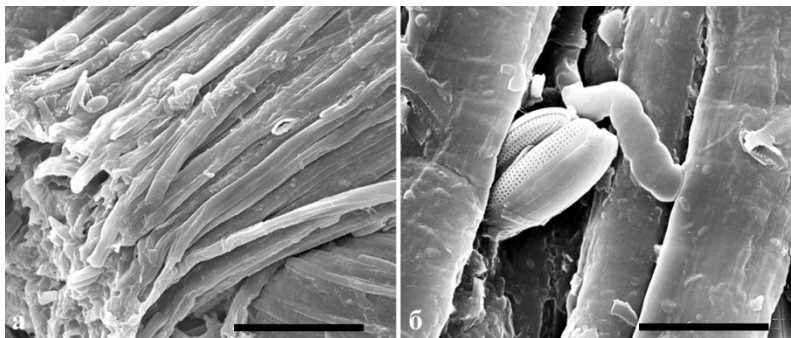


Рис. Биопленка, сформированная на каменном субстрате в литоральной зоне Южного Байкала. а – общий вид колонии нитчатой цианобактерии; б – фрагмент биопленки с филаментами цианобактерий, диатомовыми водорослями и гетеротрофными бактериями. Сканирующая электронная микроскопия. Масштаб: а – 50 мкм, б – 10 мкм

Метагеномный анализ микробных сообществ биопленок твердых субстратов выявил их высокое генетическое и таксономическое разнообразие. Основная черта бактериальных сообществ биопленок литоральной зоны оз. Байкал – это преобладание фототрофных микроорганизмов, прежде всего, цианобактерий.

По сравнению с предыдущим периодом исследования [Ижболдина, 2007] видовой состав бентосных цианобактерий в оз. Байкал в последние годы значительно изменился. Распространение и масштаб цианобактериальных обрастаний увеличился, очевидно, благодаря их успешной жизненной стратегии, они стали заселять ранее нехарактерные для них субстраты, включая эндемичные губки. Экологическая причина наблюдающейся экспансии цианобактерий в оз. Байкал неизвестна. В локальном аспекте можно заключить, что бентосные цианобактерии получают биогенные элементы из придонной воды и субстратов в количестве, достаточном для их успешной пролиферации.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-54-05005.

Литература

- Розанов А. Ю., Абызов С. С., Велш М. и др. Бактериальная палеонтология. М. : ПИН РАН, 2002. 189 с.
- Ижболдина Л. А. Атлас и определитель водорослей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо- и макрофиты) с краткими очерками по их экологии. Новосибирск : Наука-Центр, 2007. 248 с.

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* В ПРОБАХ ВОДЫ МОРЕЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

М. П. Бынина¹, Е. В. Матосова¹, О. С. Рязанова^{1,2}

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова,
г. Владивосток, e-mail: marina.bynina@mail.ru

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

В последние десятилетия значительное внимание уделяется вопросам экологического взаимодействия возбудителей инфекционных заболеваний с внешней средой. Эта тема становится еще более актуальной при изучении последствий биологического загрязнения морей патогенными для человека и животных микроорганизмами [Сомов, 2004]. К настоящему времени из морской среды выделены разные виды патогенных бактерий рода *Yersinia*. Вероятность их попадания в организм человека зависит от биотических и абиотических факторов морских экосистем, которые влияют на их жизнеспособность и сохранения патогенности [Андрюков, 2016]. Изучение вопросов о резервуарах *Yersinia*, имеет принципиальное значение, поскольку эти бактерии принадлежат к своеобразной группе микроорганизмов, которые кроме паразитирования в популяции животных и организме человека имеют выраженную сапрофитическую фазу, обеспечивающую их существование в морской воде, благодаря экологической пластичности и способности к формированию биопленок – высокоорганизованных сообществ, состоящих из клеток и межклеточного вещества – матрикса [Гостев, 2010; Терентьева, 2014]. В качестве сигналов к формированию биопленок могут служить изменения физико-химические параметров морских экосистем [Davey, 2000].

Цель работы: изучение влияния физико-химических параметров экосистем дальневосточных морей (Берингова, Охотского и Японского) на способность *Yersinia pseudotuberculosis* формировать биопленки.

Материалы и методы. В работе исследованы клинические и природные штаммы *Y. pseudotuberculosis* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова: *Y. pseudotuberculosis* 2517 – (серотип 03), утративший плазмиду вирулентности; 512 (серотип 01b) изолированный от больного и несущий плазмиду вирулентности. Морскую воду брали из акватории Амурского залива и залива Петра Великого Японского моря, Охотского и Берингова мо-

рей. Для контроля брали питательный бульон Хоттингера. При исследовании состава воды морей были определены их физико-химические параметры, а именно: мутность, соленость, pH и содержание хлорофилла. Данные получены с помощью прибора Small processing unit exclusive for AAQ series. (Япония). Исследовали способность *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 10^7 мк/мл формировать биопленку при температуре 8 °С в морской воде в течение 3, 6, 9 и 12 сут. культивирования. Количественное определение способности бактерий образовывать биопленки проводили в стандартных 96-луночных полистирольных планшетах по методу G. A. O'Toole и R. Kolter (1998 г.). Количество биопленки оценивали в планшетридепе Bio-Tek Instruments uQuant по оптической плотности при длине волны 600 нм. Полученные данные обрабатывали с использованием прикладной программы Statistica, версия 6.1 (серия 1203С для Windows).

Результаты. Установлено, что физико-химические параметры морской воды оказывают влияние на формирование биопленки штаммами *Y. pseudotuberculosis*. Самый высокий показатель солёности обнаружены в пробе из Берингова моря (рис. 1 и 2).

Проба из Охотского моря выявила самые высокие показатели по мутности и наличию хлорофилла, а из Японского моря – самые низкие. Выявлено, что *Y. pseudotuberculosis* формируют биопленку в морской воде всех исследуемых морей в течение всего времени культивирования. Самый высокий показатель роста биопленки выявлен в пробах морской воды, взятых из Охотского и Берингова морей.

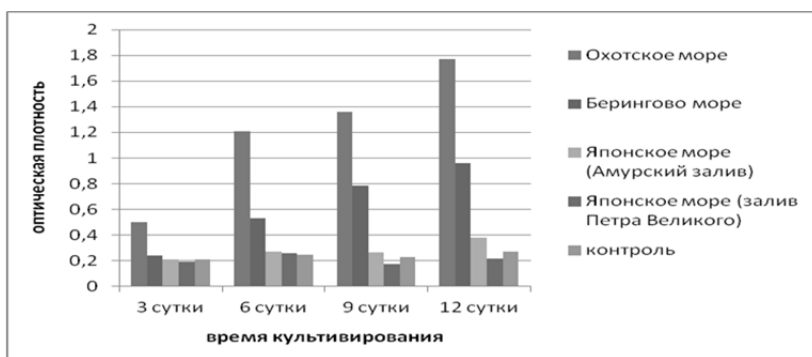


Рис. 1. Образование биопленки *Y. pseudotuberculosis* (штамм 2517) в пробах воды дальневосточных морей

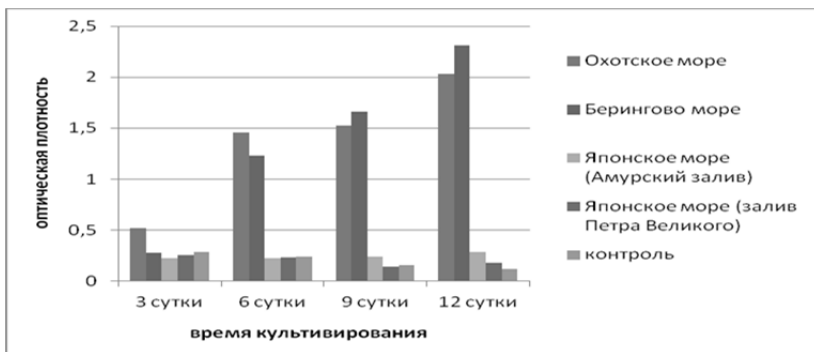


Рис. 2. Образование биопленки *Y. pseudotuberculosis* (штамм 512) в пробах воды дальневосточных морей

Заключение. Данные сравнительной характеристики динамики роста *Y. pseudotuberculosis* в биопленке свидетельствуют о том, что микроорганизмы в этих условиях проявляют высокую степень жизнеспособности и могут стать причиной заражения рыб, морепродуктов и человека.

Литература

- Андрюков Б. Г., Тимченко Н. Ф., Бынина М. П. Эколого-эпидемиологическое значение бактерий рода *Yersinia* в морских экосистемах залива Петра Великого // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2016. Т. 2, № 65. С. 11–35.
- Гостев В. В., Сидоренко С. В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010. Т. 3, № 2. С. 4–15.
- Сомов Г. П. Современные представления о сапронозах и сапрозоонозах // Ветеринарная патология. 2004. Т. 3. С. 31–35.
- Терентьева Н. А., Тимченко Н. Ф., Рассказов В. А. Исследование влияния биологически активных веществ на формирование бактериальных биопленок // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. Т. 3, № 57. С. 54–55.
- Davey M. E., O'Toole G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64. С. 4847–4867.

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PSSA*, *PSSB* И *ROS R* В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ШТАММАХ РИЗОБИЙ НА РОСТ БИОМАССЫ И ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *IN VITRO*

З. Р. Вершинина, А. М. Лавина,
Л. Р. Хакимова, А. Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа,
e-mail: zilyaver@mail.ru

На сегодняшний день существует достаточно много исследований, посвященных роли экзополисахаридов (ЭПС) в становлении бобово-ризобиального симбиоза. Тем не менее, до полного понимания функций ЭПС в формировании и функционировании симбиотических систем еще далеко. Было показано, что качество и количество полисахаридов, особенно ЭПС и липополисахаридов, вырабатываемых ризобиями, могут влиять как на их агглютинацию этих бактерий, так и на образование биопленок на поверхности корней растений, что играет решающую роль на начальных этапах симбиоза [Bogino et al., 2013]. Также было найдено, что ЭПС принимают участие в различных этапах развития инфекционной нити, бактериоидов и подавлении иммунного ответа растения-хозяина [Kelly et al., 2013]. Выявлено положительное влияние штамма *R. leguminosarum*, которые вырабатывал большее количество экзополисахарида с более высокой степенью полимеризации, чем штамм дикого типа, на биомассу растений клевера [Marczak et al., 2013]. Существует несколько работ, которые были посвящены специфичности бобово-ризобиального симбиоза, обусловленного структурой ЭПС [Kawaharada et al., 2017]. Было высказано предположение, что количество ЭПС, вырабатываемых ризобиями, связано с оптимизацией взаимодействия микросимбионта с макросимбионтом [Jones, 2012]. Таким образом, ЭПС это один из ключевых факторов для достижения успешного взаимодействия между симбиотическими партнерами.

Целью данной работы было изучения влияния сверхэкспрессии генов *pssA*, *pssB* и *rosR* в трансформированных штаммах ризобий на рост биомассы и образование биопленок *in vitro*. Для этого гены *pssA*, *pssB* и *rosR*, участвующие у ризобий в синтезе ЭПС, были амплифицированы и клонированы в векторы для трансформации бактерий pJN105 под управлением индуцибельного промотора ParaBAD и pJB658 под управлением индуцибельного промотора Pm. Полученными векторными конструкциями были трансформированы ростостимули-

рующие штаммы *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* THy2, *R. leguminosarum* TPr4 и *R. galegae* 0702. Было выявлено, что эффективность образования биопленок контрольными и трансформированными штаммами зависит от концентрации кальция Ca^{2+} в культуральной среде и температуры культивирования. При 0 мМ Ca^{2+} толщина биопленок была незначительна как в случае контрольных, так и трансформированных штаммов. Добавление в среду 1,5 мМ Ca^{2+} увеличивало толщину биопленок в среднем в 2 раза, 3 мМ Ca^{2+} – в 4 раза, 4,5 мМ Ca^{2+} – в 5 раз. В связи с этим в экспериментах с воздействием температурного режима была использована концентрация Ca^{2+} в среде 4,5 мМ. Как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки при температуре 28 °С. При культивировании при более низкой температуре способность штаммов формировать биопленки снижалась в более чем 2 два раза. При повышении температуры до 38 °С статистически значимых различий в эффективности формирования биопленок по сравнению со штаммами, выращенными при 28 °С, найдено не было. Дальнейшие исследования показали, что трансформация штаммов *R. leguminosarum* генами *pssA* и *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок. Также было выявлено, что трансформация данными генами позволяет некоторым штаммам *R. leguminosarum* преодолевать ингибирующее воздействие на биопленкообразование низких концентраций кальция в среде. Трансформация геном *pssB* уменьшала толщину биопленок *R. leguminosarum* практически в 2 раза. В случае *R. galegae* 0702 значимых различий в эффективности образования биопленок трансформированными и контрольными штаммами найдено не было.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00033 мол_а.

Литература

- Bogino P., Oliva M., Sorroche F., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // International journal of molecular sciences. 2013. Vol. 14 (8). P. 15838–15859.
- Jones K. M. Increased production of the exopolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago truncatula* // Journal of bacteriology. 2012. Vol. 194. P. 4322–4331.
- Kawaharada Y., Nielsen M. W., Kelly S., James E. K., Andersen K. R., Rasmussen S. R., Stougaard J. Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia // Nature communications. 2017. Vol. 8. P. 14534.

Kelly S. J., Muszyński A., Kawaharada Y., Hubber A. M., Sullivan J. T., Sandal N., Ronson C. W. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis // Molecular plant-microbe interactions. 2013. Vol. 26 (3). P. 319–329.

Marczak M., Mazur A., Król J. E., Gruszecki W. I., Skorupska A. Lipoprotein PssN of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: subcellular localization and possible involvement in exopolysaccharide export // Journal of bacteriology. 2006. Vol. 188 (19). P. 6943–6952.

ВЛИЯНИЕ НАРИНГЕНИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК, АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ФИТОПАТОГЕНОВ И МУТУАЛИСТОВ РАСТЕНИЙ

А. М. Гончарова, Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: alvlad87@mail.ru

Взаимодействие растений с микроорганизмами во многом определяется содержанием их корневых экссудатов. В частности, нарингенин, являясь сигнальной молекулой растений, стимулирует развитие азотфиксирующего симбиоза между бобовыми и ризобактериями [Макарова, 2010]. Известно, что наиболее предпочтительной формой жизни бактерий являются биопленки [Гостев, Сидоренко, 2010], а метаболизм бактерий в них зависит от различных сигнальных молекул, в том числе от цАМФ, вторичного мессенджера аденилатциклазой сигнальной системы (ACC) [Fuqua et al., 2001]. В связи с этим, целью нашей работы было изучить влияние нарингенина на образование биопленок, сигналинг, активность пектиназы и целлюлазы у мутуалиста гороха *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rhl*) и фитопатогена *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*).

При изучении влияния нарингенина на образование биопленок *Rhl* и *Psp* использовали широкий спектр концентраций нарингенина: 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ. В дальнейших исследованиях использовали концентрации, оказавшие влияние на плотность биопленок у каждого вида бактерий.

Результаты работы показали, что 500 пМ нарингенина стимулировали рост биопленки *Rhl*, а 1 мкМ – снижали. У *Psp* в присутствии 500 пМ нарингенина наблюдалось снижение плотности биопленок, однако при 100 нМ нарингенина наблюдалось возрастание данного показателя. При этом под воздействием специфических концентраций нарингенина у обоих видов исследуемых бактерий в самих

клетках значительно возрастал уровень цАМФ, что происходило, преимущественно, за счет большего возрастания активности аденилатциклазы по сравнению с фосфодиэстеразой. Причем, у *Rhl* повышение уровня цАМФ совпадало с активацией целлюлазы, однако активность пектиназы оставалась на уровне контроля.

В то же время в биопленках *Psp* нарингенин не оказывал влияния на активность целлюлазы и пектиназы. Вероятно, это связано с низкой актуальностью данных ферментов в патогенезе *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* т. к. он проникает в листья через устьица, не разрушая клеточной стенки растения.

Таким образом, исследования показали, что нарингенин оказывал противоположное влияние на формирование биопленок, активность компонентов АСС и факторов вирулентности мутуалиста *Rhl* и фитопатогена *Psp*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00295-мол_а.

Литература

Гостев В. В., Сидоренко С. В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010. Т. 2, № 3 – С. 4 – 15.

Макарова Л. Е. Физиологическое значение фенольных соединений при формировании бобово-ризобияльного симбиоза в неблагоприятных условиях. Иркутск : Изд-во Сиб. ин-та физиологии и биохимии растений СО РАН, 2010. 38 С.

Fuqua W. C., Parsec M. R., Greenberg E. P. Regulation of gene expression by cell-to cell communication: acyl-gomoserin lacton quorum sensing // Annu. Rev. Gen. 2001. Vol. 35. P. 439–468.

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КАК СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЦИДНОЕ И ПРОТИБИОПЛЕНОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИРИДОИДОВ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭКСТРАКТОВ МАНЖЕТКИ И ПОДБЕЛА

М. А. Живетьев, К. А. Кириченко, В. А. Быбин,
И. А. Граскова, Ю. А. Маркова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: nik.19@mail.ru

Растения синтезируют в своих тканях вещества для выживания в насыщенной патогенами окружающей среде. Такие растительные метаболиты как флавоноиды, алкалоиды, терпены и гликозиды обладают выраженной антимикробной активностью. Другие, напри-

мер, сахара и аминокислоты, могут использоваться микроорганизмами в качестве дополнительного источника питания и способствовать их размножению. Фенольная и иридоидная составляющая экстрактов лекарственных растений одновременно с бактерицидным действием часто обладает антиоксидантным эффектом. До настоящего времени недостаточно исследований, связанных с изучением влияния лекарственных растений на организацию и разрушение бактериальных образований – биопленок, которые в настоящее время рассматриваются как фактор патогенности. В представленной работе был изучен химический состав 40 и 70 % этанольных вытяжек подбела многолистного *Andromeda polyfolia* и манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* и проведено сравнение их антимикробного, пробиопленочного и антибиопленочного потенциалов.

Отбор растительного материала проводили на юго-восточном побережье озера Байкал, в 700 м от уреза озера. Отбиралась надземная часть растений. Листья растений высушивали в тени в хорошо проветриваемом помещении до воздушно-сухого состояния и измельчали до частиц размером 1–2 мм. Экстракцию проводили при соотношении сырье-экстрагент 1:30 в течение 1 ч.

Манжетка городковатая *Alchemilla subcrenata* Buser – растение семейства розоцветные (Rosaceae) со сложной систематикой внутри рода. Из фенольных соединений во всех видах манжеток преобладают флавоноиды. Манжетка широко применяется в народной медицине Сибири и Европы при дизентерии, воспалительных заболеваниях глаз, внутренних и внешних изъязвлениях и ранах.

Подбел многолистный *Andromeda polyfolia* L. болотное растение, относящееся к семейству вересковые (Ericaceae), роду вечнозеленые кустарники и кустарнички класса двудольные. Применяется в народной медицине как успокаивающее, снотворное средство, при ревматизме, отложениях солей, невралгии и головных болях. Мед с цветков подбела рекомендуют при туберкулезе, гнойных ранах, в качестве снотворного. Содержит ядовитый андромедотоксин.

Для определения антимикробного и пробиопленочного эффектов использовались грамотрицательные бактерии: фитопатогенные *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* BKM B-1247 и условно-патогенные *Escherichia coli* XL-1 Blue (“Stratagene”, США). Бесплазмидные клетки *E. coli* штамм XL1-Blue не патогенны.

Содержание сахаров в экстрактах определяли по методу Шомоди-Нельсона (ГОСТ 9. 801–82). Оптическую плотность измеряли при 508 нм. Калибровочную кривую строили по глюкозе. Общее содер-

жание фенольных соединений в пересчете на кверцетин определяли спектрометрическим методом с помощью реактива Фолина-Чокальтеу при 720 нм. Содержание флавоноидов в экстрактах определяли по качественной реакции с хлоридом алюминия. Для построения калибровочной кривой использовали коммерческий препарат кверцетина. Пробоподготовка перед ВЭЖХ-анализом включала в себя очистку экстрактов хлороформом от липофильных пигментов с последующей экстракцией фенольного комплекса этилацетатом. Качественный состав фенольной фракции экстрактов исследовали на микроколоночном высокоэффективном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (Россия) с УФ-детектором при градиентном режиме хроматографирования (градиент 40 мин от 5 до 100 % ацетонитрила), колонка длиной 75 мм, диаметром 2 мм, скорость потока 100 мкл/мин, объем пробы 4 мкл. Идентификацию полученных хроматографических пиков проводили путем сравнения их УФ-спектров с базами данных в программе МультиХром-СПЕКТР для Windows. Содержание иридоидных гликозидов в экстрактах определяли спектрометрическим методом с помощью качественной реакции с реактивом Трим-Хилла. Оптическую плотность раствора определяли при длине волны 430 нм на SPECORD S 100 («Analytikjena», Германия). Контролем служил промышленный аптечный препарат «Настойка пустырника» (ОАО «Флора Кавказа»).

Перед исследованием бактерицидного действия экстрактов из них на роторном испарителе удалялся спирт и излишки воды, полученный концентрат стерилизовали фильтрованием через бактериальный фильтр (диаметр пор 20 мкм) с последующим доведением стерильной дистиллированной водой до исходного объема. Антимикробный потенциал исследуемых экстрактов оценивали диско-диффузионным методом на газонах (МПА). Эффективность воздействия оценивали по диаметру зоны подавления роста бактерий. Бактерицидный и бактериостатический эффекты оценивали визуально по характеру зоны подавления вокруг диска. Действие экстрактов на формирование биопленок и на уже сформированную биопленку оценивали по оптической плотности окрашенных генциан фиолетовым биопленок на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 495 нм.

Полярными растворителями хорошо экстрагируются водорастворимые сахара, фенольные соединения, флавоноиды, гликозиды – обуславливающие антиоксидантные, бактериостатические, антимикробные эффекты растительных извлечений. Содержание флаво-

ноидов было достоверно выше при обоих способах экстракции из манжетки по сравнению с подбелом. Содержание фенольных соединений и иридоидов было выше в вытяжках подбела, при этом не выявлено достоверных различий в содержании сахаров. Из подбела большее разнообразие фенольных соединений извлекалось в 40 % спирт, а из манжетки – в 70 % этанол. Стерилизация экстрактов и выпаривание из них спирта не приводили к уменьшению содержания действующих веществ в экстрактах.

Исследованные экстракты обладали разной степенью антимикробного действия на газонах культур микроорганизмов. Манжетка обладала выраженным бактерицидным действием относительно *P. carotovorum* и бактериостатическим – на *E. coli*. К добавлению экстрактов подбела оба микроорганизма были устойчивы. В то же время, экстракты подбела значимо подавляли образование биопленок *P. carotovorum* и *E. coli*. Все экстракты манжетки, напротив, стимулировали рост и биопленкообразование бактерий, что обусловлено высокой антимикробной активностью флавоноидов. Исследованные экстракты в использованных концентрациях не разрушали биопленки. Учитывая, что экстракты из листьев манжетки отличались более высоким общим содержанием флавоноидов и большим разнообразием фенольных соединений, а в экстрактах подбела было гораздо больше иридоидных гликозидов, можно предполагать участие иридоидов в подавлении биопленкообразования у *P. carotovorum* и *E. coli*.

Благодарим за содействие сотрудников лаборатории физико-химических методов анализа: Т. Е. Путилину, Н. В. Семенову и Л. В. Дудареву.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) с использованием коллекций микроорганизмов ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИР СО РАН при поддержке Проекта VI. 56. 1. 2. «Исследование физиолого-биохимических основ механизмов растительно-микробных взаимодействий при различных видах стрессов».

МИКРОВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS LACUSTRIS* В СУБПОЛЯРНЫХ УСЛОВИЯХ

А. А. Кублановская, К. А. Чеканов,
О. И. Баулина, Е. С. Лобакова

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

Биопленки – многоклеточные сообщества прокариотных и эукариотных клеток, интегрированных во внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ), формирующиеся на границе раздела фаз. Биопленки являются доминирующим способом существования микроорганизмов в природных экосистемах.

Зеленая каротиногенная микроводоросль *Haematococcus lacustris* является основным эукариотическим фототрофным компонентом некоторых биопленок (микробных матов), формирующихся в скальных литоральных ваннах побережья Белого моря (Кандалакшский залив). Помимо *H. lacustris* в составе данных биопленок присутствуют диатомеи, цианобактерии разных морфотипов и гетеротрофные бактерии. Одной из стадий жизненного цикла микроводоросли *H. lacustris* являются апланоспоры (гематоцисты) – клетки, предназначенные для переживания неблагоприятных условий. В этих клетках происходит накопление широко применяемого в биотехнологии кетокаротиноида астаксантина. В период засушливой погоды наблюдалось пересыхание литоральных скальных ванн и образование корок кроваво-красного цвета, характерного для скопления апланоспор, на поверхности гранитной породы. Задачей нашего исследования было изучение морфологических и структурных особенностей корок скальных ванн зоны литорали Белого моря, определение их таксономического состава, а также изучение сохранения жизнеспособности *H. lacustris* в составе корковых биопленок.

Пробоотбор микробных матов, включающих клетки микроводоросли *H. lacustris*, проводили в июле 2017 и 2018 гг. В 2017 году водные пробы литоральных ванн содержали фрагменты биопленок, а в 2018 г., в связи с засушливой и жаркой погодой, образцы были представлены сухими корками красного цвета. Пробы были изучены с помощью световой и электронной (сканирующей, СЭМ, и трансмиссионной, ТЭМ) микроскопии. Для выявления кислых полисахаридов, основных компонентов ВПМ, была использована методика фиксации образцов с рутением красным. Таксономический состав прокариотического компонента образцов был исследован путем анализа библиотек ампликонов участка гена *16SrRNA* на платформе Il-

lumina. Для обнаружения жизнеспособности клеток и оценки способности к образованию вегетативных клеток из апланоспор сухие корки помещали в минеральную среду BG-11 и инкубировали при температуре 25 °C и дневном освещении в течение 48 ч.

На основании результатов световой микроскопии в пробах 2017 года было отмечено значительное количество гематоцист микроводоросли *H. lacustris*, а также представителей цианобактерий всех субсекций. Доминирующими морфотипами цианобактерий в образцах являлись трихомные безгетероцистные и гетероцистообразующие формы [Kublanovskaya et al., 2019]. Сканирующая электронная микроскопия данных образцов показала наличие микроводорослевых клеток и цианобактериальных трихомов, интегрированных во ВПМ. С помощью ТЭМ (методика с рутением красным) удалось визуализировать кислые полисахариды внеклеточного матрикса и подтвердить наличие структуры наподобие биопленки. Исследование поверхности сухих образцов (корок) показало наличие скоплений клеток *H. lacustris*, цианобактерий и бактерий, объединенных ВПМ. В структурах корок также были выявлены поры и каналы разного диаметра.

После помещения фрагментов корок в среду BG-11, спустя 48 ч, наблюдали формирование в среде зооспор с двумя изоконтными жгутиками, переход апланоспор к активному делению и формированию вегетативных пальмеллоидных клеток. При этом сами корки набухали и приобретали зеленый оттенок.

Известно, что переход в стадию гематоцист является основной стратегией выживания для *H. lacustris* в стрессовых условиях. В литоральных ваннах микроводоросль *H. lacustris* адаптируется не только к постоянно меняющимся температуре, освещению, влажности, но и к соляному стрессу. Формирование биопленок в виде корок выявлено в скальных солоноватых ваннах, в которых наблюдается заплеск морской воды. Таким образом, в данной работе впервые было показано, что биотехнологически значимая микроводоросль *H. lacustris* в стрессовых условиях субполярного региона образует структуры наподобие биопленок. Выдвинуто предположение, что способность к биопленкообразованию является дополнительным механизмом, в той или иной степени обеспечивающим выживание данной микроводоросли в зоне литорали Белого моря.

Литература

Kublanovskaya A., Chekanov K., Solovchenko A., Lobakova, E. Cyanobacterial diversity in the algal-bacterial consortia from subarctic regions: new insights from the rock baths at White Sea coast // Hydrobiologia. 2019. Vol. 830, N 1. P. 17–31.

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БИОПЛЕНОК ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД

З. Н. Литвиненко, Л. М. Кондратьева

Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,
г. Хабаровск, e-mail: zoyana2003@mail.ru

Подземная биосфера – одна из наименее изученных экосистем на Земле. В последнее время во многих странах активно внедряют различные технологии внутрипластовой очистки железосодержащих подземных вод. Основы технологии обезжелезивания подземных вод в водоносном горизонте (ВГ) опираются на естественные природные окислительно-восстановительные процессы и направлены на создание искусственных активно функционирующих контактных зон «вода – порода – бактериальные клетки». Применение технологии обезжелезивания и деманганации подземных вод в водоносном пласте очень часто сопровождается возникновением ряда проблем, которые связаны с недостаточной изученностью биогеохимических процессов, происходящих в водоносном горизонте [Кулаков, Кондратьева, 2008]. Одной из таких проблем является микробиологическое обрастание скважин и порового пространства ВГ, приводящее к снижению объемов откачиваемой воды и изменению органолептических показателей [Кондратьева, Литвиненко, 2014; Braun et al., 2016].

Исследование механизмов устойчивости биопленок к стрессовым факторам среды особенно актуальны и определяют возможность повышения эффективности технологии очистки подземных вод в пласте. Цель работы заключалась в определении основных факторов, влияющих на формирование биопленок в железосодержащих подземных водах, и оценке адаптационного потенциала этих микробных консорциумов.

В качестве объектов исследования были использованы микроорганизмы из проб подземных вод и биообрастаний наблюдательных скважин Тунгусского месторождения. Культивирование микробных комплексов (МК) проводили в жидкой питательной среде Бромфильда с разными добавками органических веществ (ОВ): пептон и дрожжевой экстракт (2 г/л), как легкодоступные азотсодержащие ОВ и препарат гуминовых веществ (0,025 г/л), как трудноминерализуемое ОВ сложного строения. Для оценки активности роста микроорганизмов использовали следующие показатели: изменение оптической плотности культуральной жидкости; образование слизистых биопленок (БП)

на дне колб и обрастаний на поверхности предметных стекол; световая и электронная микроскопия сформировавшихся биопленок.

Результаты экспериментов показали, что характер образования слизистых биопленок зависел, в большей степени, от доступности источника углерода и присутствия растворенных ионов железа. Это было подтверждено при анализе культуральных характеристик культивируемых представителей (МК) из разных слоев ВГ, особенно, ростом жизнеспособных представителей модельного сообщества на агаризованных питательных средах, способностью к адгезии, а также методами световой и электронной микроскопии БП. Аккумуляция в зрелой биопленке ионов кальция, железа и марганца вызывала ее уплотнение и фактически служила предпосылкой к образованию кристаллических структур вторичных минералов, заполняющих поровое пространство [Кондратьева, Голубева, 2014].

Проведенные *in vitro* исследования позволяют выделить основные факторы, которые могут влиять на адаптационный потенциал биопленок, формирующихся в поровом пространстве водоносного горизонта (табл.).

Таблица

Факторы, увеличивающие адаптационный потенциал биопленок в железосодержащих подземных водах

Фактор	Характеристика	Функция	Подтверждение
Органические вещества	Присутствие в подземных водах ОВ различного строения и генезиса способствует росту биопленок	Усиление роста и развития биопленок	Использование азотсодержащих ОВ стимулировало образование слизистых БП
Полимерный матрикс	Формирование слизистых биопленок и адгезия на твердой поверхности	Поддержка роста БП, защитная функция	МК, продуцирующие слизистый матрикс, формировали крупные биопленки
Структура микробного сообщества	Присутствие в биопленке органотрофных и железомарганцевых бактерий	Утилизация различных источников углерода и акцепторов электронов	В структуре биопленок идентифицированы бактерии родов <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>Gallionella</i> , <i>Crenothrix</i> , <i>Geothrix</i>
Элементный состав	Наличие в поровом пространстве ВГ соединений железа, марганца, кальция и магния, способствующих уплотнению биопленок	«Цементация» биопленок	Обнаружены кальцинированные глобулы, марганцевые наноструктуры, инкрустация поверхности клеток окислами Fe и Mn
Антропогенные стресс-факторы	Регенерация скважин агрессивными дезинфицирующими средствами (HCl, NaOCl, H ₂ O ₂)	Активизация защитных функций биопленки	Наличие каталазной активности и устойчивости к УФ-облучению у штаммов выделенных из биопленок

Недостаточная изученность механизмов формирования биопленок при изменении абиотических условий в водоносном горизонте, например, при искусственной аэрации приводит к колюматации скважин за счет активизации органотрофных и железомарганцевых бактерий и формирования структурированных биопленок. Экспериментальное моделирование с привлечением современных физико-химических и спектральных методов, сканирующей электронной микроскопии позволяет выявлять факторы, с помощью которых можно контролировать образование биопленок, учитывая их адаптационный потенциал.

Литература

- Кондратьева Л. М., Голубева Е. М. Образование минералов железа на цеолитовой матрице // Геология и геофизика. 2014. Т. 55, № 12. С. 1738–1747.
- Кондратьева Л. М., Литвиненко З. Н. Формирование биопленок микробными комплексами подземных вод *in vitro* // Биотехнология. 2014. № 3. С. 73–82.
- Кулаков В. В., Кондратьева Л. М. Биогеохимические аспекты очистки подземных вод Приамурья // Тихоокеанская геология. 2008. № 27 (1). С. 109–118.
- Braun B., Schröder J., Knecht H., Szewzyk U. Unraveling the microbial community of a cold groundwater catchment system // Water Research. 2016. Vol. 107. P. 113–126.

ВЛИЯНИЕ ГИДРОБИОНТОВ ТИХОГО ОКЕАНА НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE В ТОКЕ ЖИДКОСТИ

Е. В. Матосова¹, И. Н. Ляпун^{1,2}
М. П. Бынина¹, О. С. Рязанова^{1,2}

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова,
г. Владивосток, e-mail: e_matosova@mail.ru

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

Высокая актуальность проблемы формирования биопленки патогенными бактериями в организме и объектах окружающей среды связана с ее повышенной устойчивостью к антимикробной терапии и иммунным защитным реакциям, появлением затяжных и хронических инфекций. По оценкам Международного центра по контролю за заболеваниями (CDC) и Американского национального института здоровья (NIH) до 80 % заболеваний, вызываемых бактериями, в мире связаны с биопленками [Harr, 2012]. Биопленка может образовываться на различных поверхностях или на границе сред в токе жидкости, в том числе в организме человека. Полисахаридный матрикс

служит защитным барьером и не позволяет неблагоприятным факторам, в том числе антибиотикам и бактерицидным средствам, воздействовать на бактериальную клетку.

В качестве объекта исследования были выбраны бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, способные выживать и сохранять патогенность при различных условиях окружающей среды (почва, вода, в том числе морская, растения и т. д.), а также в организме животных (наземных и морских) и человека, вызывая инфекционный процесс. Во многом это связано со способностью иерсиний формировать биопленки [Терентьева, 2014]. Это обуславливает актуальность поиска препаратов, обладающих ингибирующим действием в отношении биопленок *Y. pseudotuberculosis*.

Особый интерес представляют бурые водоросли в связи с их доступностью в прибрежной зоне дальневосточных морей. Экстракты водорослей и сульфатированные полисахариды (СПС), полученные из них, в настоящее время позиционируются в качестве основы для создания биологически активных добавок к пище (БАД), продуктов функционального питания (ПФП) и лекарственных препаратов нового поколения. СПС являются уникальными по химической структуре и биологическому действию соединениями, аналогов которым нет у других организмов. Они обладают низкой токсичностью по отношению к макроорганизму и обширным спектром антибактериального действия (иммуномодулирующее, антиадгезивное, бактериостатическое) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе, против *Y. pseudotuberculosis* [Беседнова, 2014]. К настоящему времени получены продукты ферментативной трансформации СПС с установленной структурой, которые, в отличие от природных полисахаридов, могут быть стандартизованы и соответственно пригодны для создания на их основе фармакологических субстанций и лекарственных препаратов.

Цель исследования: изучение влияния СПС разной структуры на формирование биопленки *Y. pseudotuberculosis* в динамической модели, имитирующей естественные условия.

Материалы и методы: на слайды со специальным адгезивным покрытием в качестве абиотической подложки Superfrost™ Plus с постоянным положительным зарядом на поверхности (ThermoFisher Scientific, США) сорбировали водные растворы сухих экстрактов (1, 10 и 20 мг/мл) СПС, выделенные в ТИБОХ имени Г. Б. Елякова ДВО РАН (Владивосток) из водорослей: *Saccharina cichorioides*, *Saccharina japonica*, *Fucus evanescens*. Далее обработанные подлож-

ки помещались в закрытую динамическую систему, в которой циркулировала взвесь бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* вирулентного штамма 512 (I серовара) из коллекции микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова в смеси бульона Хоттингера с физраствором (1:2) в концентрации 10^9 КОЕ/мл, для формирования биопленки. До инокуляции в жидкость бактерии выращивали в течение 48 ч на скошенном агаре при температуре +4...+6 °С. Ток жидкости, 50 мл/мин, обеспечивался перистальтическим насосом (Суперстальтик-02, Россия). После инкубации в течение 72 ч (температура +22...+24 °С), промывки и окрашивания в течение 15 мин по методу Sternheimer-Malbin красителем А (на основе кристаллического фиолетового) и красителем Б (с сафранином О) с помощью спектрофотометра АКИЦ-01 (светофильтр 585 нм) измеряли значения оптической плотности в разных точках поверхности слайдов для количественной оценки биомассы биопленки.

Результаты: в результате проведенных нами исследований выявлена динамика роста биопленки *Y. pseudotuberculosis* на всех слайдах. Наибольший антиплёночный эффект был выявлен у СПС водоросли *F. Evanescons* (табл.).

Таблица

Влияние СПС *Fucus evanescons* на формирование биопленки
Y. pseudotuberculosis

Показатели	Концентрация СПС, мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Экстинкция ($M \pm m$), у. е.	63,52 $\pm$ 7,62	58,27 $\pm$ 4,54	58,60 $\pm$ 5,44	81,23 $\pm$ 7,49
Коэффициент вариации, V, %	11,98842	7,78423	9,27896	9,22151
Число наблюдений, n	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

Закключение: исследованные сульфатированные полисахариды обладают ингибирующей активностью в отношении формирования биопленки *Y. pseudotuberculosis* на абиотической поверхности. Это наиболее выражено у полисахарида водоросли *F. evanescons*. Использование таких гидробионтов Тихого океана как сульфатированные полисахариды может стать альтернативной стратегией защиты от бактериальных инфекций, вызванных ростом и развитием биопленок.

Литература

- Harr R. R. Medical Laboratory Science Review. F. A. Davis Company; 2012. 576 p.
- Беседнова Н. Н. Морские гидробионты – потенциальные источники лекарств // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. Т. 57, № 3. С. 4–10.
- Терентьева Н. А., Тимченко Н. Ф., Рассказов В. А. Исследование влияния биологически активных веществ на формирование бактериальных биопленок // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. Т. 57, № 3. С. 54–55.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ В БИОПЛЕНКАХ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Г. В. Подлесная, А. Д. Галачьянц, Ю. Р. Штыкова,
М. Ю. Сулова, О. И. Белых

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: podlesnaya@lin.irk.ru

Известно, что большинство микроорганизмов в природных условиях существуют в виде структурированных ассоциаций – биопленок [Costerton, 2007]. В водной экосистеме сообщество организмов, развивающееся на каменистых субстратах, принято называть эпилитоном [Протасов, 2010]. На границе раздела фаз воздух-вода формируется особая биопленка – поверхностный микрослой, толщина которой не превышает нескольких десятков микрометров. Данный биотоп населен специфическим сообществом микроорганизмов, называемым нейстоном [Zhang et al., 2003].

Несомненно, микроорганизмы, обитающие в биопленках литорали оз. Байкал, играют исключительно важную роль в круговороте веществ и энергии в водоеме. Азотфиксирующие бактерии или диатрофы, преобразуют газообразный азот в аммонийный, необходимый для биосинтеза основных клеточных макромолекул. Таксономическое разнообразие азотфиксаторов варьирует в зависимости от условий среды обитания [Gaby et al., 2012].

Цель данной работы – изучить таксономический состав культивируемых гетеротрофных азотфиксирующих бактерий поверхностного микрослоя и биопленок, сформированных на каменистых субстратах в литорали оз. Байкал.

Пробы поверхностного микрослоя и эпилитона отобраны в июне, августе и сентябре 2017 г. в трех котловинах литоральной зоны озера Байкал. Чистые культуры бактерий изолировали на безазотистой среде Эшби. Идентификацию культур проводили с помощью молекулярно-генетического анализа фрагмента гена 16S рНК.

Всего в работе выделено 50 штаммов: 30 – из поверхностного микрослоя, 20 – из биопленок на каменистых субстратах. Полученные изоляты хорошо росли на безазотистых средах, содержащих в качестве единственного источника углерода и энергии маннит, сахарозу или этиловый спирт. На среде Эшби с маннитом штаммы образовывали желтые, оранжевые, розовые, кремовые, белые и бесцветные колонии разной формы.

Согласно результатам филогенетического анализа гена 16S рРНК, таксономическое разнообразие коллекции азотфиксирующих бактерий, полученной из поверхностного микрослоя, представлено 5 филлами и 15 родами: 12 штаммов отнесены к классу Alphaproteobacteria (рода *Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Roseomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthobacter*), 2 – к классу Betaproteobacteria (род *Massilia*), 2 – к классу Gammaproteobacteria (род *Acinetobacter*), 7 – к филе Actinobacteria (рода *Curtobacterium*, *Microbacterium*), 5 – к филе Bacteroidetes (рода *Dyadobacter*, *Spirosoma*, *Flavobacterium*), 1 – к филе Deinococcus-Thermus (род *Deinococcus*), 1 – к филе Firmicutes (род *Paenibacillus*).

В биопленках, сформированных на каменистых субстратах, разнообразие бактерий-дiazотрофов представлено 5 филлами и 12 родами: 2 штамма отнесены к классу Alphaproteobacteria (рода *Phyllobacterium*, *Rhizobium*), 1 – к классу Betaproteobacteria (род *Jantiniobacterium*), 10 – к классу Gammaproteobacteria (род *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Pantoea*), 1 – к филе Actinobacteria (род *Paeniglutamicibacter*), 4 – к филе Bacteroidetes (рода *Dyadobacter*, *Flavobacterium*), 1 – к филе Deinococcus-Thermus (род *Deinococcus*), 1 – к филе Firmicutes (род *Paenibacillus*).

Разнообразие бактерий в различных биотопах зависит от условий окружающей среды. Выявлено, что в эпилитических биопленках преобладали diaзотрофы класса Gammaproteobacteria, в поверхностном микрослое – представители класса Alphaproteobacteria и филы Actinobacteria. Отличительной особенностью полученной коллекции азотфиксаторов являлась высокая доля пигментированных бактерий, выделенных из поверхностного микрослоя, что обусловлено интенсивной освещенностью данного биотопа.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 0345-2019-0003 (AAAA-A16-116122110061-6) «Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем...» и проекта РФФИ № 18-34-00309 (AAAA-A18-118032190039-1) «Характеристика бактериального сообщества поверхностного микрослоя...».

Литература

- Протасов А. А. Перифитон как экотопическая группировка гидробионтов // Journal of Siberian Federal University. Biology. 2010. № 1. С. 40–56.
- Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., Marrie T. J. Bacterial biofilms in nature and disease // Annu. Rev. Microbiol. 1987. Vol. 41. P. 435–464.
- Gaby, J. C., Buckley, D. H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase // Plos One. 2012. Vol. 7.
- Zhang Z. Studies on the sea surface microlayer. II. The layer of sudden change of physical and chemical properties // J. Colloid Interface Sci. 2003. Vol. 264, N 1. P. 148–159.

ДЕЙСТВИЕ СТРЕПТОМИЦИНА НА ПЛАНКТОННЫЕ КУЛЬТУРЫ И БИОПЛЕНКИ *ESCHERICHIA COLI* В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

З. Ю. Самойлова, Г. В. Смирнова, О. Н. Октябрьский

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН,
г. Пермь, e-mail: samzu@mail.ru

Стрептомицин является антибиотиком группы аминогликозидов широкого спектра действия. Он широко используется при лечении инфекций мочеполовой системы, вызываемых грамотрицательными бактериями, в частности, *Escherichia coli*. Довольно часто совместно с антибиотикотерапией, а также в качестве профилактики назначаются отвары лекарственных растений *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium* sp., *Betula pendula* и *Laminaria japonica*. Отвары зеленого и черного чая являются постоянными составляющими пищевого рациона человека. Экстракты этих лекарственных растений обладают выраженными про- и антиоксидантными свойствами [Akagawa et al., 2003; Samoilova et al., 2014], которые могут оказывать модулирующее влияние на бактерицидные эффекты антибиотиков [Daglia et al., 2012].

Целью данной работы явилось изучение влияния экстрактов лекарственных растений на бактерицидное действие антибиотика стрептомицина в культурах бактерий *E. coli*, находящихся в разном физиологическом состоянии.

В экспериментах использовались планктонные культуры, полученные из 16 ч инокулята, выращенного на минимальной среде М9 с добавлением глюкозы, тиамина, казаминовых кислот [Miller, 1972]. Также использовали 22 ч планктонные культуры, развивавшиеся над поверхностью биопленок, и отмытые зрелые 22 ч биопленки. Бактериальные культуры помещали на 96-луночные полистироловые

планшеты со свежей средой и экстрактами (0,83 и 6,64 мг сухого вещества/мл), инкубировали 1 ч при 37 °С в термостате Sky Line (ELMI, USA) при 340 rpm, затем добавляли 100 мкг/мл стрептомицина, что соответствовало 10 МИК, и инкубировали еще 2 ч. Параметры роста оценивали с помощью спектрофотометра xMark™ Bio-Rad по оптической плотности культуры при 600 нм. Стандартными бактериологическими методами оценивали выживаемость бактериальных культур и рассчитывали скорость бактерицидного эффекта [Regoes et al., 2004]. При этом биопленки предварительно отмывали и ресуспендировали в физиологическом растворе, дезинтегрировали на ультразвуковом дезинтеграторе (Ultrasonic cleaning unit Elmasonic S10 H, Elma) в режиме двух пульсов, каждый продолжительностью 1 мин, с 1 мин паузой между пульсами.

Через 2 ч инкубации необработанных экстрактами культур скорость бактерицидного эффекта стрептомицина составила $-5,2 \pm 0,5$; $-4,2 \pm 0,5$ и $-2,4 \pm 0,1$ ч⁻¹, соответственно в 16 ч планктоне, 22 ч биопленках. Наблюдаемая разность в эффектах на планктонные культуры объясняется различной скоростью роста в момент добавления антибиотика, которая была равна $1,02 \pm 0,05$ и $0,42 \pm 0,05$ ч⁻¹ в 16 ч и 22 ч планктоне, соответственно. Это согласуется с известной повышенной чувствительности к стрессу быстрорастущих культур бактерий [Gilbert et al., 1990]. Как и ожидалось, наиболее устойчивыми к действию стрептомицина были зрелые биопленки.

Обнаружено, что предобработка экстрактами модулировала интенсивность и направление (синергизм/антагонизм) бактерицидного эффекта стрептомицина при действии на все типы культур.

Низкие дозы экстрактов зеленого и черного чая, *A. uva-ursi*, *B. pendula* и *L. japonica* вступали в синергизм с антибиотиком при действии на зрелые биопленки, повышая скорость бактерицидного эффекта приблизительно на 20 %. Аналогичным образом, низкие дозы экстракта *A. uva-ursi* потенцировали бактерицидный эффект при действии на быстрорастущие планктонные культуры на 18 %.

Высокие дозы экстрактов зеленого и черного чая, *B. pendula* и *L. japonica* оказывали антагонистическое действие, понижая бактерицидный эффект стрептомицина приблизительно на 20 %. Высокие дозы экстракта *V. vitis-ideae* снижали бактерицидный эффект в 3,5 раза. Также высокие дозы экстрактов зеленого и черного чая, *A. uva-ursi* и *V. vitis-ideae* подавляли бактерицидный эффект антибиотика в медленно растущем планктоне до 3 раз. В быстрорастущем планк-

тоне высокие дозы экстракта *V. vitis-ideae* снижали токсический эффект антибиотика на 24 %.

Таким образом, в большинстве изученных ситуаций значительные модулирующие эффекты обнаруживались в присутствии зеленого и черного чая, *A. uva-ursi* и *V. vitis-ideae*.

Интерес представляет синергизм стрептомицина и низких доз исследованных нами экстрактов при действии на зрелые биопленки, который с повышением дозы экстрактов превращается в противоположный эффект.

Представляет интерес синергизм стрептомицина и низких доз исследованных нами экстрактов при действии на зрелые биопленки, который с повышением дозы экстрактов превращается в противоположный эффект. На практике это означает, что регулярный прием концентрированных отваров тестируемых лекарственных растений в сочетании с антибиотиками может приводить к значительному снижению эффективности антибиотикотерапии как в случае биопленкообразующих возбудителей инфекций, так и культивируемых патогенов.

В совокупности, результаты работы указывают на необходимость корректировки схем лечения, включающих совместный прием антибиотиков и фитопрепаратов.

Полученные данные представляют практический интерес и нуждаются в дальнейшем изучении.

Исследование выполнено в рамках государственного задания № госрегистрации темы 01201353246, а также при поддержке грантами Президента МК-3376.2018.4 и Программы УрО РАН AAAA-A18-118041890005-1.

Литература

Akagawa M., Shigemitsu T., Suyama K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions // Biosci Biotechnol Biochem. 2003. Vol. 67. P. 2632–2640.

Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents // Curr Opin Biotechnol. 2012. Vol. 23. P. 174–181.

Gilbert P., Collier P. J., Brown M. R. W. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response // Antimicrob Agents Chemother. 1990. Vol. 34. P. 1865–1868.

Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.

Regoes R. R., Wiuff C., Zappala R. M., Garner K. N., Baquero F., Levin B. R. Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens // Antimicrob Agents Chemother. 2004. Vol. 48. P. 3670–3676.

Samoilova Z., Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics // Microbiol Res. 2014. Vol. 169. P. 307–313.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ *CHI*-ГЕНОВ *FRANCISELLA TULARENSIS* И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ХИТИНАЗ

А. К. Сынгеева, Е. С., Куликалова, А. В. Мазепа, А. В. Корнева,
В. Б. Николаев, Е. Ю. Марков, С. Н. Козлов

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора,
г. Иркутск, e-mail: ayuna_syngeeva@mail.ru

Туляремия остается актуальной проблемой здравоохранения в связи с наличием на территории Российской Федерации устойчивых во времени и пространстве природных очагов. Характерной чертой их эпизоотических и эпидемических проявлений является приуроченность к водным источникам. Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* демонстрирует высокую выживаемость в условиях окружающей среды. Одним из таких механизмов адаптации может служить способность туляремийного микроба к гидролизу хитина, широко распространенного в природе и входящего в состав экзоскелета членистоногих, насекомых. Данное свойство позволяет возбудителю туляремии сохраняться как в переносчиках, так и в водоемах в ассоциации с простейшими и другими водными обитателями.

Установлено, что туляремийный микроб продуцирует активные хитиназы, обеспечивающих доступ к питательному субстрату [Margolis et al., 2010]. Выявлено четыре гена хитиназ, также отмечено, что по степени хитинолитической активности среди штаммов *F. tularensis* и *F. novicida* есть различия [Chandler et al., 2011].

Изучение хитиназной активности у разных подвидов туляремийного микроба позволит прояснить степень значения хитиназ в экологии возбудителя, механизме персистенции и адаптации в условиях окружающей среды.

Цель исследования – идентификация и характеристика генов хитиназ (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*) у штаммов *F. tularensis* разных подвидов и вирулентности, фенотипическая характеристика штаммов по экспрессии хитиназ.

Материалы и методы. Для изучения фенотипического проявления туляремийного микроба по хитиназному признаку и молекулярно-генетического исследования генов, кодирующих хитиназы, в работе использовали 9 штаммов *F. tularensis* четырех подвидов и субпопуляций, полученные из музея живых культур «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и

Дальнего Востока». Штаммы выращивали на плотной питательной среде, смывали физиологическим раствором и готовили суспензии клеток. Все работы проводились в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Определение нуклеотидных последовательностей генов хитиназ проводилось с использованием автоматического секвенирования на ДНК-анализаторе ABIPrism 3000. Для дальнейшего анализа откорректированные последовательности загружались в базу данных GenBank.

Экспрессию хитинолитической активности оценивали в препаратах целых интактных клеток и их лизатах, получаемых методом быстрого замораживания/оттаивания, в реакции энзимодиффузии в агарозных гелях, содержащих в качестве субстрата суспензию коллоидного хитина. Результат регистрировали визуально по прозрачным зонам гидролиза.

Результаты и обсуждения. Гены *chiC* имеют размер от 1173 п. н. до 2853 п. н. В последовательностях *F. tularensis* subsp. *holarctica* обнаружена делеция участка GGGAAA в гене *chiC*_1592, которая приводила к появлению стоп-кодона и концевому усечению гена. Также была обнаружена делеция цитозина в гене *chiC*_1579 у двух штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-126, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 385, которая также приводила к образованию стоп-кодона, и, соответственно, изменению хитиназной активности. Полученные нуклеотидные последовательности генов хитиназ депонированы в GeneBank: *F. tularensis* subsp. *holarctica* 201 (*chiA* KY563318.1); 15V (*chiC* MG728101.1); I-391 (*chiC* MG728100.1); I-250 (*chiA* MG728099.1); *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* B-7892 (*chiA* MF984201, *chiD* MF363049.1, *chiA* MF984202, *chiC* MG728102.1, *chiC* MF984202.1, *chiA* MF984201.1); 385 (*chiC* MF398390.1).

Фенотипическая оценка экспрессии активных хитиназ методом зимографии показала, что все исследованные штаммы туляремийного микроба, выращенные при 37 °С на плотной питательной среде, проявляют хитинолитическую активность. По результатам анализа наиболее активным хитинолитическим комплексом обладают штаммы подвида *novicida*, а также некоторые штаммы подвида *holarctica*,

демонстрирующие выраженную активность в полноте гидролиза субстрата, проявляя эндо- и экзоактивность. Они образовывали зону полного гидролиза субстрата уже в первые сутки инкубации. Препараты остальных исследуемых штаммов в эти сроки проявляли только частичный гидролиз субстрата, при этом масштабы их активности практически не отличались от таковых у штаммов *novicida*. Признаки гидролиза у этих штаммов проявились лишь на 6–9-е сутки, что указывает на более низкую активность компонентов, ответственных за экзохитиноподобную активность, либо на более низкий уровень экспрессии этих гидролаз в сравнении со штаммами *novicida*. В случае штамма подвида *nearctica* слабая хитиная активность регистрировалась только в препаратах, полученных способом замораживания/оттаивания. Штаммы подвида *mediasiatica* заняли промежуточное положение.

Таким образом, показано, что хитиноподобную активность проявляют все штаммы *F. tularensis*. Активность хитиноподобного комплекса отличается у подвигов туляремийного микроба. Выявление мутации, приводящие к изменению структуры гена *chiC*.

Литература

- Chandler J. C., Molins C. R., Petersen J. M., Belisle J. T. Differential chitinase activity and production within *Francisella* species, subspecies and subpopulations // J. Bacteriol. 2011. Vol. 193, N 13.
- Margolis J. J., El-Etr S., Joubert L. M., Moore E., Robison R. et al. Contributions of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* chitinases and Sec secretion system to biofilm formation on chitin // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76, N 2.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

И. С. Федотова, А. С. Гладких, Л. В. Миронова

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск, e-mail: fedotova-is95@mail.ru

Холера – особо опасная инфекционная болезнь, проблема которой для мирового здравоохранения стоит на сегодняшний день достаточно остро. Территория РФ имеет статус благополучной по холере, регистрируемые случаи заболеваний носят завозной характер. Этиологический агент текущей пандемии, *Vibrio cholerae* биоварианта Эль Тор, способен длительное время сохраняться и при благо-

приятных условиях накапливаться в воде поверхностных водоемов. Показано, что персистенции холерных вибрионов в неблагоприятных условиях способствуют формируемые ими ассоциации, называемые биопленками, способные стать резервуаром сохранения и накопления возбудителя.

В нашем исследовании предпринята попытка изучения механизма и динамики процесса биопленкообразования у штаммов *V. cholerae* путем сравнения морфологии биопленок, экспрессии структурных и регуляторных генов, а также их белковых спектров. В исследование взяты 5 штаммов различных серогрупп, выделенные из водоемов Сибири и Дальнего Востока (табл.) в рамках мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов. Штаммы выращивали на 1 % пептонной воде, изучение морфологии и динамики формирования биопленок на границе раздела фаз вода-воздух проводили в эксперименте, учитывая результат через 6, 24, 48 и 72 ч с помощью методов световой и электронной микроскопии. Также оценивали экспрессию структурных и регуляторных генов *vpsA*, *vpsL*, *vpsR* и *vpsT* [Zamorano-Sanchez, 2015], участвующих в синтезе вибриоидного полисахарида (VPS), обеспечивающего формирование матрикса биопленок [Teschler, 2015]. Экспрессию изучали методом ПЦР в режиме реального времени, в качестве референсного был использован ген *gyrA*, кодирующий синтез гиразы, для оценки изменения экспрессии использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ [Rao, 2013]. Получение пептидных спектров проводили методом масс-спектрометрии MALDI-ToF, обработку спектров исследуемых штаммов проводили в программе Mass-Up.

Таблица

Перечень штаммов *V. cholerae*, взятых в исследование

№ п/п	Наименование штамма	Серогруппа	Номер	Место обнаружения
1	<i>V. cholerae</i>	O1	1–17	Иркутская область, г. Иркутск, р. Ушаковка
2	<i>V. cholerae</i>	O1	137–17-Б	Забайкальский край, г. Борзя, р. Борзя
3	<i>V. cholerae</i>	R-вариант	102–16-Н	Приморский край, г. Находка, оз. Соленое
4	<i>V. cholerae</i>	R-вариант	156–16-Н	Приморский край, г. Находка, оз. Соленое
5	<i>V. cholerae</i>	Non O1/O139	25–13	Иркутская область, г. Иркутск, р. Ушаковка

Исследование морфологии и скорости формирования биопленок штаммов *V. cholerae* разных серогрупп выявило ряд отличий. Быстрее биопленкообразование протекало у штаммов R-варианта, сформированная биопленка отличалась наибольшей плотностью, эластичностью и стойкостью по отношению к малым механическим воздействиям. Штамм *V. cholerae* не O1/O139 спустя 72 ч не образовывал устойчивой биопленки. В ходе эксперимента были отмечены изменения экспрессии генов синтеза полисахаридов всех изучаемых штаммов. Анализ полученных данных показал, что у штаммов O1-серогруппы и R-вариантов в наибольшей степени экспрессировался структурный ген *vpsA*, при этом в зависимости от штамма максимальное значение экспрессии в клетках наблюдалось через 6; 48 и 72 ч. У штамма не O1/O139 этот же ген экспрессировался в меньшей степени, что коррелирует с отсутствием плотной сформированной биопленки в ходе эксперимента. Другой структурный ген полисахаридов *vpsL* оказался в меньшей степени подвержен изменениям экспрессии.

Гены регуляции биопленкообразования *vpsR*, *vpsT* также испытывали изменения экспрессии в ходе эксперимента, формы кривых структурных и регуляторных генов коррелировали. У трех штаммов в наименьшей степени экспрессировался ген *vpsR*, у штамма *V. cholerae* O1-серогруппы 1–17 – ген *vpsT*. К концу эксперимента у четырех штаммов наблюдалось снижение уровня экспрессии генов *vpsT*, *vpsA*, *vpsL*, тогда как у штамма *V. cholerae* не O1/O139 экспрессия всех генов к концу опыта увеличивалась. Вероятно, формирование биопленки у штаммов не O1/O139 происходит медленнее и лишь через 72 ч был запущен механизм биопленкообразования. Через 24 ч у штамма R-варианта 102–16-Н биопленка была полностью сформирована и отмечалась репрессия генов полисахаридов в дальнейших точках эксперимента.

Анализ масс-спектрометрического профиля пептидов в диапазоне 2–20 кДа показал зависимость белкового спектра штаммов в большей степени от времени культивирования, нежели от принадлежности к серогруппе. На основании масс-спектрометров штаммы были объединены в кластеры согласно времени отбора проб (0, 6, 24, 48, 72 ч). Исключение составил штамм 102–16-Н R-варианта, детектируемые спектры которого были объединены в единый кластер.

Таким образом, показаны различия в морфологии и динамике формирования биопленок у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, получены данные об экспрессии структурных и регуляторных

генов и изменениях в белковых спектрах штаммов при биопленкообразовании. Полученные данные расширяют представление об адаптивной вариабельности штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. Выяснение генетической детерминированности полученных различий является предметом наших дальнейших исследований.

Литература

Rao X. et al. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013. № 3 (3). P. 71–85.

Teschler J. K., et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms // *Nature Reviews Microbiology.* 2015. № 13. P. 255–268.

Zamorano-Sanchez D., et al. Identification and characterization of VpsR and VpsT binding sites in *Vibrio cholerae* // *Journal of bacteriology.* 2015. Vol. 197, N 7. P. 1–50.

ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛОХТОННЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ БИОПЛЕНОК И ПЛАНКТОНА ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Ю. Р. Штыкова, С. А. Потапов, А. Ю. Краснопеев,
И. В. Тихонова, Е. В. Суханова, Г. В. Подлесная,
О. И. Белых

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск,
e-mail: tulupova@lin.irk.ru

В настоящее время во всем мире вследствие антропогенного воздействия наблюдается ухудшение экологического состояния пресных водоемов – основных источников питьевой воды. Согласно долговременным наблюдениям, в пелагиали оз. Байкал микробиологические показатели были достаточно постоянными в течение длительного времени, однако в последние годы отмечено поступление аллохтонных микроорганизмов в прибрежные районы озера, в том числе и потенциально опасных для здоровья человека [Timoshkin et al., 2016].

С помощью высокопроизводительного секвенирования определены генетический состав и структура метагеномных сообществ водной толщи, эпилитических биопленок, донных осадков озера Байкал, отобранных в литорали возле поселков Большие Коты, Большое Голоустное и р. Большая Голоустная в летний период 2017 г.

В микробиомах разных биотопов выявлено 1245142 последовательностей гена 16S рРНК, 8716 оперативных таксономических единиц (ОТЕ), отнесенных к 18 бактериальным филумам. В составе сообществ доминировали филумы *Proteobacteria* (47,5 %), *Cyanobacteria* (32,6 %), *Actinobacteria* (12,7 %) и *Firmicutes* (6,2 %).

Среди полученных последовательностей были отмечены представители семейств Enterobacteriaceae, Neisseriaceae, Moraxellaceae и Legionellaceae, включающие большинство условно-патогенных, а также патогенных видов, которые можно считать аллохтонными для экосистемы озера. Наибольшее количество последовательностей аллохтонных бактерий обнаружено в донных осадках, отобранных вблизи пос. Б. Голоустное, их доля в микробиоме достигала 78 %. В биопленках, сформированных на камнях, аллохтонные бактерии составляли 53 %, в придонной и поверхностной воде 7 и 4 %, соответственно. В районе пос. Б. Коты их число было ниже, и доля в микробных сообществах различных экотопов не превышала 1 %. Наиболее часто встречались последовательности семейства Enterobacteriaceae (энтеробактерии), таксономический состав которого отличался разнообразием, включая рода *Enterobacter*, *Pantoea*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Buttiauxella* и *Rouxella* (рис.). Последовательности рода *Enterobacter* имели 100 % сходства с видами *E. ludwigii* и *E. cloacae*, входящими в состав «*Enterobacter cloacae* complex», а род *Pantoea* представляли виды *P. agglomerans* и *P. septica*, клинически значимые как возбудители нозокомиальных инфекций [Paauw et al., 2008]. Наиболее разнообразные флотипы обнаружены для семейства Moraxellaceae рода *Acinetobacter*: *A. baylyi*, *A. pittii*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. townneri*, входящие в состав нормальной микробиоты человека и животных. Особое внимание вызвало присутствие в воде и биопленках прибрежных участков значительного количества флотипов, принадлежащих роду *Legionella* (семейство Legionellaceae), известного своими патогенными видами, вызывающими острые инфекционные полиорганные заболевания.

Полученные данные свидетельствуют об интенсивном антропогенном влиянии и неблагоприятном санитарно-микробиологическом состоянии прибрежных вод исследуемых районов, особенно в акватории пос. Б. Голоустное.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 0345-2019-0003 (AAAA-A16-116122110061-6) «Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем...» и проекта 18-34-00513 мол а «Метагеномная характеристика вирусного сообщества в оз. Байкал».

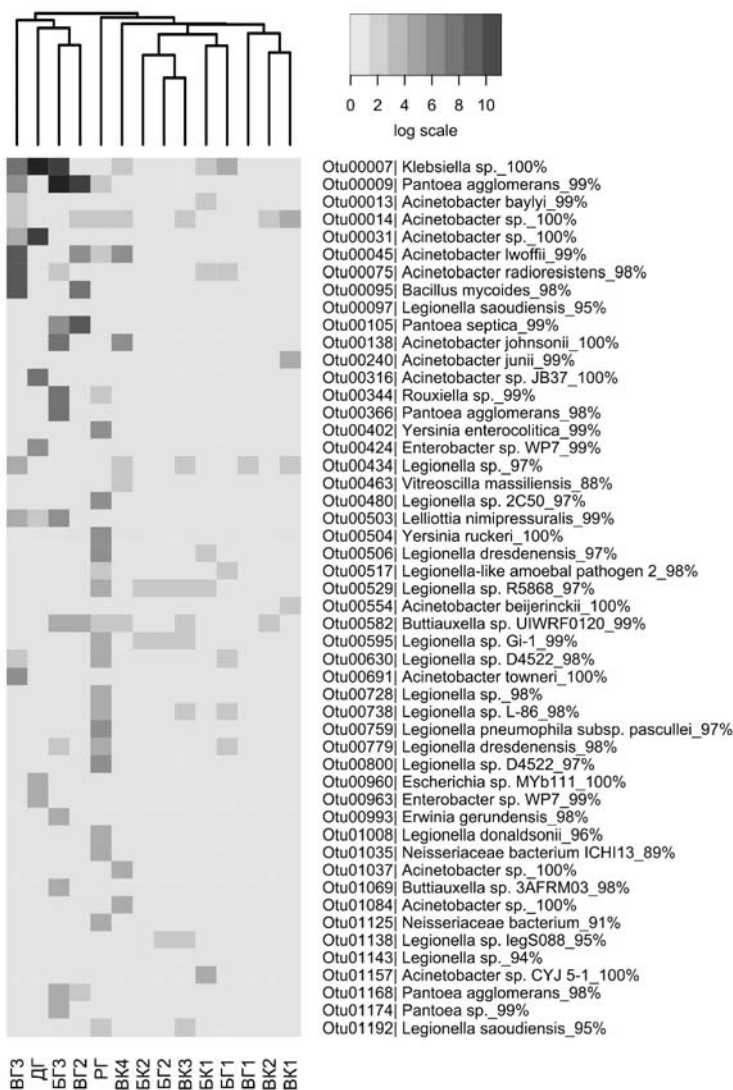


Рис. Тепловая карта представленности 50 доминирующих ОТЕ из числа условно-патогенных в метагеномных образцах сообществ воды, биопленок, донных осадков, отобранных в прибрежных водах возле поселков Б. Коты, Б. Голоустное и р. Б. Голоустная с указанием ближайших гомологов и процента сходства с репрезентативной последовательностью согласно BLASTn-поиску (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в базе нуклеотидных последовательностей GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Значения представленности ОТЕ были приведены к логарифмической шкале. ВК и ВГ – пробы воды возле поселков Б. Коты и Б. Голоустное, соответственно; БК и БГ – пробы биопленок возле поселков Б. Коты и Б. Голоустное, соответственно; РГ – проба воды р. Б. Голоустная; ДГ – проба донных осадков возле пос. Б. Голоустное

Литература

Paauw A., Caspers M. P. M., Schuren F. H. J. et al. Genomic Diversity within the Enterobacter cloacae Complex // PLoS ONE. 2008. Vol. 3 (8). e3018. doi: 10.1371/journal.pone.0003018.

Timoshkin O. A., Samsonov D. P., Yamamuro M. et al. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // Journal of Great Lakes Research. 2016. Vol. 42. P. 487–497.

МЕЖВИДОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ В ПОЛИКУЛЬТУРАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКЕ КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ ИХ САМОРЕГУЛЯЦИИ В БИОЦЕНОЗЕ (НА МОДЕЛИ *SALMONELLA* ENTERITIDIS, *ESCHERICHIA COLI* И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*)

А. А. Яковлев, Н. Ф. Тимченко, А. Л. Пономарева,
А. В. Раков, А. И. Еськова, Е. В. Матосова

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова,
г. Владивосток, e-mail: yakovlev-epid@yandex.ru

В современный период становится все более понятным, что в естественных условиях биопленки чаще формируются не одним, а несколькими видами бактерий [Bogosian et al., 1998], поскольку общинный образ жизни является нормальным способом роста и выживания для многих видов бактерий. В таких условиях межклеточные взаимодействия неизбежны и, в конечном счете, приводят к созданию плотных, сложных и высокоструктурированных популяций бактерий, инкапсулированных в самовоспроизводящийся внеклеточный матрикс и способных к скоординированному и коллективному поведению [Тимченко и др., 2019]. Ввиду этого большую фундаментальную и практическую значимость имеет изучение именно поликультуральных биопленок, нежели экспериментальные исследования структур, образованных одним видом микроорганизмов.

Salmonella Enteritidis, *Escherichia coli* и *Yersinia pseudotuberculosis* – актуальные бактериальные патогены, формирующие вспышки болезней, в основном, пищевого характера. При этом все они, как известно, способны создавать биопленки как на абиотических, так и на биотических поверхностях. В этой связи особо значимой является попытка понять сложность межбактериальных взаимодействий, как конкурентных, так и кооперативных (интеграционных), которые могут встречаться в таких консорциумах. Важно подчеркнуть, что именно интеграционно-конкурентные взаимодействия микроорга-

низмов обеспечивают стабильность существования паразитарных систем и являются ведущей регулирующей силой их саморегуляции в биоценозе [Яковлев и др., 2018]. Однако экспериментальные исследования этого плана немногочисленны.

В настоящей работе нами рассмотрено взаимодействие между *S. Enteritidis* и *E. coli*, а также – *S. Enteritidis* и *Y. pseudotuberculosis* в процессе биопленкообразования. В качестве объектов исследования использовали штаммы *S. Enteritidis*, *Y. pseudotuberculosis* серотип 1b из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, и *E. coli*, выделенные от здорового человека. Выявление моно- и смешанных биопленок микроорганизмов проводили на абиотической поверхности, используя спектрофотометрический метод [O'Toole, 1998]. Оптическую плотность определяли при 600 нм. Для оценки количества бактерий, участвующих в биопленкообразовании, высев проводили согласно стандартной методике [Ерошенко, 2015]. Учет численности культур проводили на 1-е, 3-и, 6-е сутки. Высев осуществляли на селективные питательные среды: висмут-сульфитный агар для *S. Enteritidis*, среду Эндо для *E. coli*. среду 67 – для *Y. pseudotuberculosis*. Все эксперименты проводили в 4-кратной повторности. При статистической обработке данных использовали программу MS Excel 2010.

Как показали результаты эксперимента, все исследуемые штаммы бактерий проявляли высокую способность к образованию монокультуральных биопленок. При этом в первые сутки наблюдения численность жизнеспособных клеток *S. Enteritidis* в биопленке резко возросла (на 5 порядков от $8,39 \pm 0,98 \cdot 10^3$ до $1,78 \cdot 0,1810^7$ КОЕ/мл) и в последующие 3- и 6-е сутки оставалась на достигнутом уровне. В отличие от этого при формировании биопленок штаммом *E. coli* его численность возрастала постепенно и максимального значения достигла только на 6-е сутки наблюдений.

При формировании бикультуральных биопленок экспоненциального роста численности *S. Enteritidis* в первые сутки эксперимента, как это было нами выявлено в монокультуральной биопленке, не наблюдалось. Она нарастала постепенно и в последующие сутки наблюдения была сопоставима с теми же показателями в монокультуре. Темпы роста штаммов *E. coli*, а также показатели их численности и в моно-, и в бикультуральной биопленке существенно не различались. Не выявлено и статистически значимых различий между численностью клеток *S. Enteritidis* и *E. coli* в бикультуральных биопленках.

В тоже время при изучении динамики формирования биопленки как моно-, так и смешанными культурами *S. Enteritidis* и *Y. pseudotuberculosis* нами установлено нарастание показателей биопленкообразования в течении всего срока наблюдений (табл.). Однако следует отметить, что к 6-м суткам рост биопленки *Y. pseudotuberculosis* по сравнению с *S. Enteritidis* замедлялся более чем в три раза. Количество биопленки, образованной смешанными культурами, соответствовало количеству биопленки *S. Enteritidis*.

Таблица

Биопленки *Y. pseudotuberculosis* и *S. Enteritidis*

Моно- и смешанные культуры бактерий	A ₆₀₀	
	3 сут.	6 сут.
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0,574	0,625
<i>S. Enteritidis</i>	1,617	1,779
<i>Y. pseudotuberculosis</i> + <i>S. Enteritidis</i>	1,572	1,790

Таким образом представленные нами результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что в поликультуральных биопленках исследуемых видов бактерий между ними реализуются конкурентные взаимоотношения. В паре *S. Enteritidis* и *E. coli* последняя препятствует активному росту сальмонелл, тогда как *S. Enteritidis* вызывает торможение роста *Y. pseudotuberculosis*.

Литература

- Ерошенко Д. В., Коробов В. П. Сравнительный анализ формирования и разрушения биопленок PIA-отрицательных бактерий *Staphylococcus epidermidis* под действием гидролитических факторов // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2015. № 1 (29). С. 28–36.
- Тимченко Н. Ф., Раков А. В., Терентьева Н. А. Яковлев А. А. Характеристика смешанных биопленок бактерий семейства *Enterobacteriaceae* *Yersinia pseudotuberculosis* и *Salmonella Enteritidis* in vitro // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2019. № 1 (77). С. 19–22
- Яковлев А. А., Поздеева Е. С. О возможных механизмах саморегуляции паразитарных систем в биогеоценозе // Вестник РАМН. 2018. № 3(73). С. 195–205
- Bogosian G., Morris P. J. L., O Neil G. P. A mix culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state // Appl. Environ. Microbiol. 1998. N 64. P. 1736–1742.
- O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 28. P. 449–461.

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА БИОКОНВЕРСИЮ ГЛЮКОЗЫ В ЭТАНОЛ КЛЕТКАМИ *ZYMONAS MOBILIS*, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ

И. С. Андреева¹, А. И. Закабунин², Симаков А. В.³,
Е. И. Рябчикова¹, Б. Н. Зайцев¹

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, г. Кольцово Новосибирской обл.;
e-mail: andreeva_is@vector.nsc.ru

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск;

³Институт катализа им. Борескова СО РАН, г. Новосибирск

Среди разнообразных методов иммобилизации фиксация микробов на неорганических носителях привлекательна тем, что не требует предварительной активации поверхности носителей. Кроме того, неорганические носители достаточно просты в изготовлении и дешевы. В настоящей работе представлены результаты исследования гетерогенных биокатализаторов, полученных на основе одного из наиболее перспективных для производства биоэтанола микроорганизмов – бактерии *Zyomonas mobilis* [1, 2], иммобилизованной на гранулированных и монокристаллических неорганических носителях, изготовленных из алюмосиликатов, оксида алюминия и диоксида титана в Институте катализа им. Борескова СО РАН согласно [3, 4].

Иммобилизацию клеток штамма *Z. mobilis* В-1233 (коллекция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) проводили при 4 °С в среде RM, содержащей 1 % дрожжевого экстракта, 0,02 М фосфата калия, 4 % глюкозу (рН 5,0). Эффективность адсорбции определяли

по разности суммарной оптической плотности бактериальной суспензии при 600 нм до и после контакта с носителями. Формирование биопленки контролировали, исследуя образцы поверхности носителя с помощью сканирующей электронной микроскопии (микроскоп SolverP47Bio, производство ЗАО НТ-МДТ, Россия). Ферментацию проводили с использованием среды RM с глюкозой до 15 % при температуре 30 °С.

На поверхности носителей при сканирующей электронной микроскопии через сутки после нанесения можно было обнаружить отдельные клетки, их группы, а также фрагментарные многослойные образования. В течение последующей недели при температуре 30 °С на поверхности всех носителей образовывалась хорошо развитая биопленка.

Исследование токсического воздействия неорганических носителей на Z. mobilis было проведено с использованием электронной микроскопии ультратонких срезов клеток. Уже при исследовании интактных клеток, свободно растущих в среде RM в присутствии глюкозы, было показано, что популяция клеток гетерогенна по своей ультраструктуре и представлена четырьмя морфологическими типами. В результате взаимодействия клеток *Z. mobilis* с носителями в популяции контактных клеток наблюдали перераспределение морфотипов, в ряде случаев были обнаружены элементы выраженной деструкции клеток. Причем наибольшие изменения происходили при их контакте с оксидом алюминия, который, среди испытанных образцов неорганических носителей, отличался наибольшей адсорбционной способностью, а наименьшие – в присутствии алюмосиликатов. Важно отметить, что при таких изменениях ультраструктуры жизнеспособность клеток *Z. mobilis* сохранялась, они были способны образовывать на поверхности носителей развитую биопленку и функционировать продолжительное время.

Исследование факторов, влияющих на биоконверсию глюкозы в этанол клетками *Z. mobilis*, иммобилизованных на неорганических носителях. Схема получения гетерогенного биокатализатора на основе неорганических носителей включала этапы: 1) предварительную промывку носителя дистиллированной водой для удаления мелких частиц, сушку, заполнение носителем реактора и стерилизацию; 2) внесение в реактор с носителем ночной культуры *Z. mobilis*, выращенной в среде RM, содержащей 4 % глюкозы, и выдержку системы в течение ночи для адсорбции клеток в холодильнике; 3) пропускание через реактор среды RM, содержащей 4–15 % глюкозу, со ско-

ростью разбавления $0,05\text{--}0,1\text{ ч}^{-1}$ при температуре $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3–7 дней для образования на поверхности носителей развитой бактериальной биопленки. Исследовали зависимость выхода этанола от скорости подачи реакционной смеси в реактор, температуры культивирования, повышения продукции этанола за счет изменения характера потока среды через реактор.

Известно, что выход биоэтанола в значительной мере зависит от скорости подачи реакционной смеси в реактор. В самом начале исследования было определено, что равновесное состояние устанавливалось уже через 20 мин после изменения скорости подачи питательной среды в реактор. Очевидно, что увеличение скорости потока питательной среды через реактор приводит к закономерному снижению выхода этанола. Максимальные выходы этанола наблюдались при минимальной скорости подачи среды через реактор, причем реактор на основе гранулированного оксида алюминия был более эффективен – он имел и большее значение производительности и более широкий диапазон скоростей разбавления, в котором это значение сохраняется.

Температура также является одним из важнейших факторов, определяющих метаболическое состояние клеток и их способность к выживанию. Клетки *Z. mobilis* обычно культивируют и используют в технологических процессах при температуре $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Полученные результаты для монолитного реактора показывают, что при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ выход этанола был выше в 1,5–2,3 раза, чем при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Аналогичные результаты были получены при работе реактора на основе гранулированного оксида алюминия при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 дней (время проведения опыта). Масштабирование процедуры получения биоэтанола было проведено в термостатируемых проточных реакторах с использованием блоков монолитов в виде правильной шестигранной призмы с каналами треугольной формы и сечением $4\times 4\times 4$ мм, толщиной стенок 0,8 мм. Внешний диаметр каждого монолита составлял 38–40 мм. Волуметрическая производительность по этанолу лабораторного ферментера с их использованием была сопоставима с таковой у проточных реакторов с объемом 6–12 мл. При скорости разбавления, обеспечивающей максимальный выход биоэтанола, реактор сохранял работоспособность в течение всего периода проведения испытаний (1,5 месяца).

Повышения эффективности биоконверсии глюкозы в этанол клетками *Z. mobilis*, иммобилизованными на неорганических носителях, можно добиться изменением характера потока среды с суб-

стратом через реактор. В опыте использовали поток с полным заполнением реактора средой при подаче раствора в направлении снизу вверх и поверхностное течение раствора через реактор с его подачей в направлении сверху вниз небольшими каплями на осушенный слой биокатализатора. Показано, что при поверхностном течении среды через реактор достигается в 2–3 раза более высокая продуктивность по этанолу.

Проведенные исследования показали, что неорганические гранулированные и монолитные носители на основе алюмосиликатов, оксида алюминия и диоксида титана могут успешно использоваться для иммобилизации этанологенной бактерии *Z. mobilis*, способны обеспечивать биоконверсию глюкозы в этанол с волюметрической производительностью по этанолу 20–80 г/л/ч, что удовлетворяет требованиям для использования в промышленности [5]; организация поверхностного потока среды через реактор способствует значительному повышению волюметрической продуктивности реакторов по этанолу (в 1,8–3,1 раза); гетерогенные биокатализаторы могут быть использованы для биоконверсии глюкозы в этанол в течение длительного времени в реакторах аналитического и лабораторного масштаба. Авторы благодарят сотрудников института катализа СО РАН Сазонову Н. Н. и Куликовскую Н. А. за участие в изготовлении носителей и помощь в обсуждении материалов.

Литература

- Doelle H. W., Kirk L., Crittenden R., et al. // Crit. Rev. Biotechnol. 1993. Vol. 13. P. 57–98.
Rogers P. L., Jeon Y. J., Lee K. J., Lawford H. G. // Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 2007. Vol. 108. P. 263–288.
Ляхова В. Ф., Баранник Г. Б., Исмагилов З. Р. и др. // 1997. Патент РФ № 2080918.
Комова О. В., Симаков А. В., Кирчанов А. А. и др. // 1998. Патент РФ № 2106197
Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 63. P. 258–266.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

В. В. Будаева¹, Г. Ф. Миронова¹, Е. И. Кашеева¹, Е. К. Гладышева¹,
Ю. А. Гисматулина¹, А. Н. Жариков², Е. А. Скиба¹

¹ Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
г. Бийск, e-mail: budaeva@ipcet.ru

² Алтайский государственный медицинский университет,
г. Барнаул, e-mail: zhar67@mail.ru

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) синтезированная продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической питательной среде представляет собой линейный полисахарид, образованный единицами глюкозы, связанными β -1,4 гликозидными связями. БНЦ характеризуется высокой химической чистотой и, в отличие от растительной целлюлозы, не содержит в своем составе лигнина, гемицеллюлоз и других компонентов. Химическая чистота БНЦ подтверждена методом инфракрасной спектроскопии [Gladysheva, 2018]. Методом растровой электронной микроскопии установлено, что БНЦ имеет трехмерную сетчатую структуру, организованную волокнами диаметром от 3,0 до 3,5 мкм, которые, в свою очередь, образованы пучками более тонких целлюлозных микро – и наноразмерных фибрилл. Перечисленные фундаментальные свойства БНЦ (химическая чистота и наноархитектура) определяют высокие влагоудерживающую способность и механическую прочность. Отделенные друг от друга микро – и нановолокна БНЦ создают обширную площадь поверхности, что позволяет ей удерживать большое количество воды. Водородные связи между этими фибриллярными единицами стабилизируют всю конструкцию и придают ей механическую прочность [Bagud, 2016].

Известно, что БНЦ характеризуется высоким индексом кристалличности и преимущественным содержанием алломорфа 1 альфа. И тем не менее, авторами обнаружена высокая реакционная способность БНЦ к ферментативному гидролизу, выход глюкозы составил 99,5 % [Kashcheyeva, 2019]. Влажный образец БНЦ характеризовался более высокой скоростью гидролиза, по сравнению с высушенным. Высокая реакционная способность БНЦ к ферментативному гидролизу является фундаментальным свойством данного продукта биосинтеза и может быть обоснована чрезвычайно высокой пористостью как влажного, так и сухого образцов БНЦ, одинаково организованного трехмерной сеткой микрофибрилл диаметром 30–90 нм и мезоразмерными порами.

Огромный опыт исследования способов получения на основе растительной целлюлозы нитратов целлюлозы позволил авторам исследовать способность БНЦ к химической трансформации. В мировой практике данная тема мало изучена [Luo, 2018], в России информация по получению нитратов БНЦ вообще отсутствует. При нитровании образцов БНЦ серно-азотной кислотной смесью получены нитраты БНЦ со следующими характеристиками: содержание массовой доли азота – 11,45 %, вязкость – 1900 сП, растворимость в спиртоэфирной смеси – 15,8 %, растворимость в ацетоне – 100,0 %. Обнаружено образование органогеля при определении вязкости. Замещение ОН-групп на NO₂-группы в полученных нитратах БНЦ подтверждено методами инфракрасной спектроскопии и ядерного магнитного резонанса. Полученные данные свидетельствуют о возможности синтеза нитратов на основе БНЦ с требуемым диапазоном массовой доли азота. Значительное отличие вязкости нитратов БНЦ от нитратов растительной целлюлозы обусловлено как высокой степенью полимеризации БНЦ (3100–5100), так и наличием уникальной сетчатой наноструктуры. Таким образом, высокая реакционная способность БНЦ к нитрованию может быть отнесена к фундаментальным свойствам БНЦ.

Кроме вышеперечисленных фундаментальных свойств, важное значение имеют свойства БНЦ, определяющие ее широкое применение в медицине. Достаточно подробно описана биосовместимость БНЦ и создание на основе БНЦ многочисленных композиций для медицины [Barud, 2016]. По полученным в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России результатам лиофильно высушенные образцы БНЦ проявляют самостоятельную гемостатическую активность (патент РФ 2624242). Установлено, что сухая БНЦ обладает гемостатической эффективностью в 1,8 раза больше по сравнению с самым эффективным препаратом «Гемотексом».

К фундаментальным свойствам влажной БНЦ в хирургии можно отнести пластичность, конгруэнтность, биоинтегрируемость, умеренную фиксацию, способность к регенерации ткани непосредственно под БНЦ, а также обнаруженную авторами [Жариков, 2018] гемостатическую эффективность. Проведение их собственных исследований показало отсутствие инфицирования материала после наложения БНЦ на шов тонкой кишки на 14-е и 45-е сут. послеоперационного периода. На 14-е сут. вокруг БНЦ и тонкой кишки образовывалась незрелая соединительная ткань в виде легких фибринозных сращений. При анализе фиксации материала на 45-е сут. отме-

чены активные признаки формирования более плотных фиброзных структур на тонкой кишке с БНЦ, появление молодого «фибрина» с одновременным уменьшением пограничной лейкоцитарной инфильтрации [Жариков, 2018]. Авторы предполагают, что наблюдаемая гемостатическая эффективность влажной НБЦ основана на способности трехмерной сетчатой структуры способствовать свертыванию крови на поверхности наноразмерной сетки за счет попадания тромбоцитов в ее мезопоры.

Исследования физико-химических фундаментальных свойств выполнены при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054)

Литература

Gladysheva E. K., Skiba E. A., Zolotukhin V. N., Sakovich G. V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // Appl Biochem Microbiol. 2018. Vol. 54, N 2. P. 179–187.

Barud H., Silva R. R., Barud H., Tercjak A., Gutierrez J., Lustri W. R., Oliveira O. B., Ribeiro S. J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose // Carbohydr Polym. 2016. Vol. 153. P. 406–420.

Kashcheyeva E. I., Gladysheva E. K. ; Skiba E. A. ; Budaeva V. V. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose // Cellulose. 2019. Vol. 26. P. 2255–2265.

Luo Q., Zhu J., Li X., Duan Z., Pei C., Mao C. The Solution Characteristics of Nitrated Bacterial Cellulose in Acetone // New Journal of Chemistry. 2018. Vol. 42(22). P. 18252–18258.

Жариков А. Н., Лубянский В. Г., Гладышева Е. К., Скиба Е. А., Будаева В. В., Семенова Е. Н. Укрепление тонкокишечного шва с помощью бактериальной наноцеллюлозы: экспериментально-морфологическое исследование // Бюллетень медицинской науки. 2018. № 4 (12). С. 48–53.

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ КИСЛОРОДА НА СИНТЕЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У АКТИНОБАКТЕРИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

М. Е. Краснова¹, Д. В. Аксёнов-Грибанов^{1,2},
Е. В. Переляева¹, У. А. Васильева¹, Е. С. Протасов¹,
М. А. Тимофеев^{1,2}

¹ НИИ биологии ФГБОУ ВО «ИГУ», г. Иркутск,
e-mail: marriekrasnova@gmail.com

² АНО Байкальский исследовательский центр, г. Иркутск,
e-mail: denis.axengri@gmail.com

В связи с увеличением роста числа таких заболеваний, как ревматоидный артрит, болезнь Паркинсона, Альцгеймера и других, в развитии которых большую роль играет окислительный стресс, представляется актуальным поиск новых антиоксидантов и их продуцентов, а также оценка потенциала их применения в биофармацевтике [Mohammadipannah, 2018]. Природные соединения, обладающие антиоксидантной активностью, способны вступать во взаимодействие со свободными радикалами и ингибировать развивающееся окисление, наблюдаемое зачастую при стрессовых и патологических состояниях, и тем самым участвовать в профилактике и лечении заболеваний [Niki, 2010; Halliwell, 2006].

Особый интерес для поисковых исследований представляют микроорганизмы древних экосистем и озера Байкал. Экосистема озера Байкал характеризуется высоким процентом эндемичных организмов и специфичными условиями среды, в частности – низкой концентрацией минеральных солей, низкой температурой воды, которая, в свою очередь, влияет на высокую насыщенность кислородом. Предполагается, что такие условия среды обитания позволили микроорганизмам сформировать защитные механизмы к повышенному содержанию кислорода в среде обитания. В то же время исследований по поиску природных соединений, обладающих антиоксидантной активностью, в экосистеме озера Байкал, не проводилось.

Целью данного исследования являлась оценка биотехнологической и антиоксидантной активности актинобактерий, выделенных из байкальских эндемичных амфипод.

В ходе исследования проведен пробоотбор байкальских эндемичных амфипод видов *Eulimnogammarus verrucosus* и *E. cyaneus*, проведена фиксация недифференцированных тканей в растворах криопротекторов для последующего выделения и культивирования

штаммов актинобактерий. Для оценки состава бактериального метабенома амфипод отобраны образцы гемолимфы. Вместе с тем, выделенные штаммы актинобактерий культивировали при стандартных условиях и в атмосфере повышенного содержания кислорода для оценки состава природных соединений, синтезируемых штаммами при помощи подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией высокого разрешения и использованием базы данных Dictionary of Natural products.

Установлено, что в условиях насыщенной кислородом атмосферы происходит интенсификация роста актинобактерий, в сравнении с обычными условиями. При проведении визуальных осмотров посевов гемолимфы *E. verrucosus*, инкубируемых в атмосфере с повышенным содержанием кислорода, не было выявлено ни одного штамма актинобактерий (как и в случае стандартных условий культивирования). В случае анализа посевов *E. cyaneus*, инкубируемых в атмосфере с повышенным содержанием кислорода, установлено, что через 3 дня после посева были получены первые актинобактериальные колонии (на обеих питательных средах). В итоге за весь период эксперимента в условиях экспонирования чашек Петри в атмосфере повышенного содержания кислорода предварительно было получено 47 антибактериальных культур, в т. ч. 19 штаммов выделено на среде TSB, 28 штаммов – на среде MS. Одна из проб характеризовалась активным появлением актинобактериальных штаммов по сравнению с другими образцами. Всего из данного образца было получено 18 разных чистых культур актинобактерий. Таким образом, как показали первые проведенные исследования, обогащенная кислородом среда являлся фактором, значительно увеличивающим возможность выделения актинобактериальных культур, их видовое разнообразие, а также скорость проведения исследований.

В ходе анализа хроматограмм и дерепликации природных соединений были выявленные как известные, так и неизвестные природные соединения. Большая часть соединений была найдена как в экстрактах контрольных образцов, так и в экстрактах штаммов, культивируемых в повышенном содержании кислорода. Выявлено наличие 4 неизвестных соединений со временем удержания и массами 5.11 мин (452,33493 Да), 14.53 мин (354,04679 Да), 17.72 мин (790,66172 Да), 20.85 мин (550,49637 Да), обнаруженных в контрольных образцах и не синтезируемых в условиях кислорода. Анализ антирадикальной активности экстрактов проводили с применением DPPH реактива. В ходе анализа в экстрактах штамма, культи-

вируемого при стандартных условиях, антирадикальная активность повышалась спустя 22 дня эксперимента, 36 дней и после 80 сут. В то же время, антирадикальная активность экстрактов, полученных из микроорганизмов, культивируемых в атмосфере повышенного содержания кислорода, повышалась лишь однократно, спустя 30 дней эксперимента. В связи с этим были обнаружены соединения со временем удержания и массами 5.79 мин (341,03476 Да), 9.99 мин (596,18821 Да), 11.30 мин (582,20950 Да), 12.64 мин (564,18760 Да), 16.51 мин (672,22001 Да), синтезируемые в контрольном образце, проявляющим антиоксидантную активность и в образце с повышенным содержанием кислорода с аналогичной активностью. Вместе с тем, важно отметить, что в ходе проведенных работ с использованием текущих методов масс-спектрометрического анализа, могли быть выявлены изменения в содержании вторичных метаболитов, продуцируемых штаммами.

Таким образом, показано, что среда культивирования, обогащенная кислородом, оказывает благоприятное влияние на рост актинобактериальных культур и открывает новые возможности поиска новых соединений с антирадикальной активностью.

Настоящее исследование проведено при частичной финансовой поддержке проектов РНФ (18-74-00018), РФФИ (18-34-00294, 18-29-05051), проектов Минобрнауки РФ 6.9654.2017/8.9, а также АНО Байкальский исследовательский центр и Фонда поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал»

Литература

- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? // J Neurochem. 2006. Vol. 97. P. 1634–1658.
- Mohammadipanah F, Momenilandi M. Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents // Pharm Biol. 2018. Vol. 56, N 1. P. 51–59.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo* // Free Radic Biol Med. 2010. Vol. 49. P. 503–515.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНДОФИТА *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ РОСТА РАСТЕНИЙ ПРИ ПЕРЕУВЛАЖНЕНИИ ПОЧВЫ

З. М Курамшина¹, Р. М Хайруллин², Л. Р. Саттарова¹

¹Стерлитамакский филиал ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Стерлитамак, e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа,
e-mail: krm62@mail.ru

Целенаправленное использование ростстимулирующих бактерий (PGPB), в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве является многообещающей перспективой для создания эффективных и экологически чистых технологий с целью обеспечения продовольственной безопасности. Одними из первых бактерий, успешно применяемых в качестве агентов биологического контроля патогенов сельскохозяйственных культур и для стимуляции роста растений, были бактерии рода *Bacillus* [Kumar et al., 2012]. Бациллы относятся к перспективным объектам биотехнологии, т. к. они повсеместно распространены, имеют высокую адаптивную способность к различным условиям окружающей среды и синтезируют метаболиты широкого спектра действия [Hirooka, 2014]. Эндوفитные бактерии рода *Bacillus* представляют интерес в первую очередь как потенциальные агенты так называемого системного биоконтроля, так как проникают внутрь растений. Однако эти микроорганизмы способны влиять на физиологические процессы, определяющие устойчивость к действию и абиогенных стресс-факторов среды.

Считается, что будущее изменение климата может сильно повлиять на урожайность культурных растений. Это может быть связано с негативным воздействием температуры, засоленности почв, изменения pH, периодическими сменами засух или проливными ливнями и т. д. [Yadav et al., 2017]. Переувлажнение является одним из главных экологических факторов, оказывающих влияние на биологические свойства почв. В последнее время происходит существенное увеличение площади гидроморфных почв. Эти почвы, помимо временного переувлажнения, подвержены и сопутствующим процессам: оглеению, осолодению, оподзоливанию и засолению. Длительное переувлажнение приводит к значительным изменениям эколого-биологических свойств почв. В подтопленной почве уменьшается обмен воздуха (кислорода) между почвой и атмосферой, что вызывает снижение роста корней (особенно в верхних слоях почвы),

снижается транспорт воды и минеральных веществ через корни к верхней части растения; увеличивается рост микробов, следствием чего может быть повышение содержания сульфидов и масляной кислоты, токсичных для растения, повышается риск распространения почвенных патогенов и корневых заболеваний. Превышение воды может также увеличить количество насекомых и сорняков [Liu et al., 2017].

Целью исследования явилось изучение влияния инокуляции семян эндوفитными бактериями *Bacillus subtilis* штамма 26Д на рост и микоризацию сельскохозяйственных растений (пшеницы и гороха) в условиях переувлажнения почвы. Исследования проводили в лабораторных условиях. Для эксперимента использовали откалиброванные ровные семена, после предварительной обработки бактериями производили посев семян в почву. Контрольные семена обрабатывали водой. Для эксперимента использован чернозем выщелоченный. Переувлажнение имитировали путем полива дистиллированной водой до 70 %, 80 %, 90 % от полной полевой влагоемкости (ППВ). Растения через 2 месяца извлекали из земли, не повреждая корней и листьев, промывали в проточной воде. На весах определяли массу побегов. Корни отмывали, окрашивали и анализировали на наличие микоризы [Trouvelot, 1986].

В результате исследований было установлено, что рост растений в условиях переувлажнения сильно ингибировался. Длина побегов растений, необработанных бактериями и выросшими при влажности почвы 80 % и 90 % от ППВ, была у пшеницы меньше на 4,8 % и 5,6 %, у гороха – на 10 % и 40,6 %, соответственно, по сравнению с контрольными растениями (растения, необработанные бактериями и растущие при влажности 70 % от ППВ). У растений, предварительно обработанных бактериями и выросших в условиях избытка почвенной влаги (80 % и 90 % от ППВ), длина побегов у пшеницы была больше на 10 % и 3,8 %, а у гороха – на 29,1 % и 31,4 %, по сравнению с растениями, необработанных бактериями и выросших при тех же условиях. Рост корней растений также ингибировался, но у обработанных бактериями в условиях избыточной влажности показатели были больше, чем у необработанных.

Частота микоризации в корневой системе у необработанных бактериями растений при влажности почвы 80 % и 90 % от ППВ уменьшалась: у пшеницы на 1,7 % и 14,5 %, у гороха на 9,8 % и 17,5 % соответственно, по сравнению с растениями, выросшими при влажности почвы 70 % от ППВ. У обработанных бактериями расте-

ний частота микоризации при 80 % и 90 % влажности от ППВ была больше: у пшеницы на 2,3 % и 3,2 %, у гороха на 5,8 и 4,5 % соответственно, по сравнению с необработанными бактериями растений, растущими в тех же условиях. Подобные изменения наблюдали и при исследовании других показателей микоризации.

Таким образом, обработка семян спорами эндофитного штамма бактерий *B. subtilis* 26Д способствует уменьшению отрицательного эффекта переувлажнения почвы на формирование микоризы в корневой системе растений.

Литература

Kumar P., Dubey R. C., Maheshwari D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens // Microbiol. Res. 2012. Vol. 167 (8). P. 493–499.

Hirooka K. Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2014. Vol. 78(9). P. 1471–1484.

Yadav A. N., Verma P., Singh B., Chauahan V. S., Suman A., Saxena A. K. Plant Growth promoting bacteria: biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture // Advances in Biotechnology and Microbiology. 2017. Vol. 5(5). Article 555671. doi: 10.19080/AIBM.2017.05.5556671

Liu H., Carvalhais L. C., Crawford M., Singh E., Dennis P. G., Pieterse C. M. J., Schenk P. M. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria // Frontiers in Microbiology. 2017. Vol. 8. Article 2552. doi: 10.3389/fmicb.2017.02552.

Trouvelot A. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle / A. Trouvelot, N. Kough, V. Gianinazzi-Pearson // Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae / eds. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. Paris : INRA Press, 1986. P. 217–221.

ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ

О. А. Ножкина¹, А. И. Перфильева¹,
И. А. Граскова¹, Б. Г. Сухов²

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: smallolga@mail.ru

²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: boris_sukhov@mail.ru

Картофель является универсальной хозяйственной культурой, подверженная, как и другие культурные растения, бактериальным заболеваниям, таким как кольцевая гниль, вызываемая грамположительной бактерией *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms). Заболевание проявляется в некрозе листьев, увядании растения, нарушении обмена веществ у растений преимущественно в пе-

риод вегетации [Oosthuizen, 2017]. Распространение этого возбудителя зависит от климатических условий. Несмотря на то что *Cms* не является карантинным организмом в России, ареал распространения возбудителя в стране расширяется. По оценкам Европейской и Средиземноморской организации защиты растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) потери урожая картофеля в России от заболевания кольцевой гнилью могут достигать 47 % [Ngezahayo, 2017]. Все меры борьбы с кольцевой гнилью сводятся к обеззараживанию инвентаря, тары и мест хранения экологически не безопасными агрессивными реагентами. Для успешной регуляции численности возбудителя и эффективной борьбы с растительным патогеном необходимо знать фундаментальные аспекты взаимодействия растений картофеля с бактерией. Поэтому целью нашей работы стало изучение такого симбиоза.

В работе использовались шесть сортов растений картофеля *Solanum tuberosum* L. *in vitro*: Лукьяновский, Луговской, Сарма, Беллароза, Розара, Жуковский ранний, взятые из коллекции растений СИФИБР СО РАН, бактерии штамма Ac 1405, полученный из все-российской коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН. Сорта растений, выращенные в климатических камерах СИФИБРа. Микроклональное размножение растений производили методом черенкования, на агаризованной питательной среде Мурасиге – Скуга. Бактерии культивировали на агаризованной дрожжевой питательной среде с добавлением глюкозы в условиях термостата при температуре 24 °С. Для экспериментов использовали односуточную культуру в форме суспензии. Для экспериментов растения растирали в ступках в стерильных условиях до кашицеобразного состояния с добавлением 700 мкл дистиллированной воды. При помощи центрифугирования (центрифуга MiniSpin) в течение 5 мин при 14500 об/мин отделяли растительные ткани от супернатанта, в который в последствии подсаживали бакрети и инкубировали в течение 2 сут. в аэрируемых условиях. Далее осуществляли исследование бактерий на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали камерой AxioCam MRm3 и обрабатывали с помощью программного обеспечения AxioVision Rel8.2.

Количество мертвых клеток определяли с применением красителя пропидий йодида («Biotium», США) [Yamori, 2005]. Для количественного подсчета мертвых клеток анализировались следующие показатели: ширина и длина клеток бактерий; общее количество

клеток в поле зрения; количество мертвых клеток (% от общего количества бактерий). Результаты были статистически обработаны с использованием программы MS Excel.

При рассмотрении полученных результатов следует, что инкубация в водном экстракте сортов картофеля Беллароза, Розара и Сарма обладают бактериостатическим эффектом по отношению к патогенной бактерии *Cms* (наблюдалось значительное снижение количества клеток по сравнению с контролем). Также отмечалось много мертвых клеток в образцах сортов Розара (40 %), Белларозе (20 %) и Сарме (20 %). Инкубация *Cms* в водных экстрактах сортов Луговской и Жуковский ранний несколько снижала количество клеток в поле зрения. Картофель сорта Луговской оказывал негативное влияние на жизнеспособность клеток бактерий, до 30 % погибших. В свою очередь в экстракте сорта Жуковский ранний мертвых клеток было очень мало. При культивировании бактерий в картофельном соке растений сорта Лукьяновский количество клеток было сравнимо с контролем, причем практически все они были живыми.

В ходе исследований было выявлено, что водные растворы растений картофеля изменяли морфологию бактерий. Было выявлено увеличение ширины и уменьшение длины бактериальных клеток. Было отмечено незначительное уменьшение ширины клеток *Cms* после инкубации в водных экстрактах сортов Жуковский ранний, Луговской и Лукьяновский и максимальное укорачивание клеток при инкубации в водных экстрактах сортов Лукьяновский и Жуковский ранний. Инкубация бактерий в водных экстрактах сортов Сарма, Розара, Беллароза и Луговской приводила к удлинению клеток по сравнению с контролем. Вероятно, это связано с тем, что в тканях картофеля сортов Жуковский ранний и Лукьяновский имеются условия, благоприятные для интенсивного деления бактериального патогена и мы наблюдаем молодые клетки. Тогда как в вариантах Луговской, Беллароза, Розара и Сарма длина клеток была больше, чем в контроле, что, по-видимому, объясняется снижением жизнеспособности бактерий, отсутствием их деления, старением.

Полученные результаты могут быть объяснены сортовой спецификой исследуемых растений картофеля, так как сорта Луговской, Розара, Беллароза, Сарма устойчивы к ряду патогенов. Проведенные в настоящей работе исследования свидетельствуют о возможности применения описанной методики для быстрой идентификации устойчивости картофеля к патогенным бактериям.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента Российской Федерации № МК-1220.2019.11 и Фонда федерального имущества Российской Федерации и Правительства Иркутской области (проект № 17-416-380001).

Литература

Oosthuizen C, Arbach M, Meyer D, Hamilton C, Lall N. Polysulfides from *Allium sativum* as Immunomodulators, Hepatoprotectors, and Antimycobacterial Agents // Journal Med Food. 2017. Vol. 20 (7). P. 685–690. doi: 10.1089/jmf.2016.0137.

Ngezahayo J, Ribeiro SO, Fontaine V, Hari L, Stévigny C, Duez P. In vitro Study of Five Herbs Used Against Microbial Infections in Burundi // Phytother Res. 2017. Vol. 31(10). P. 1571–1578. doi: 10.1371

Yamori W, Kogami H, Masuzawa T. Freezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method // Polar. Biosci. 2005. Vol. 18. P. 73–81.

РосЕвроплант Высококачественный семенной картофель сортов немецкой селекции выращивание и реализация // Каталог. 2013–2014. С. 19.

Каталог Сорта картофеля, возделываемые в России : ежегод. справ. изд. М. : Агропас, 2013. 150 с.

СОЗДАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВЫ ОТ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ГЕРБИЦИДОВ И СТИМУЛЯЦИИ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

П. И. Орловская, М. Н. Мандрик-Литвинкович,
Э. И. Коломиец

Институт микробиологии, г. Минск, e-mail: orlovskapi@gmail.com

В современном мире широко используются различные химические препараты для снижения количества сорной растительности и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Среди них немалая доля принадлежит гербицидам классов сульфонилмочевины и имидазолинонов. Данные соединения достаточно эффективно подавляют рост сорной растительности, однако при их нерегламентированном применении остаточные количества способны долго сохраняться в почве и снижать урожай последующих культур севооборота, а также включаться в геохимический круговорот веществ и перемещаться в водные экосистемы.

Для снижения негативных последствий воздействия гербицидов на почву и получения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции необходимо проводить регулярные ремедиации почвы. Одним из способов ремедиации является использование консорциума микроорганизмов с взаимодополняющими свойствами (высо-

кая деструктивная активность, синтез биологически активных веществ с фитозащитным и ростстимулирующим действием), что позволит обезвредить токсические компоненты в почве и защитить растения от их воздействия, снизить общий инфекционный фон почвы, повысить урожайность и качество сельскохозяйственной продукции.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы являлось создание бактериального консорциума с деструктивными, фитозащитными и ростстимулирующими свойствами, обеспечивающего снижение остаточных количеств гербицидов классов сульфонилмочевины и имидазолинонов в почве, а также защиту и стимуляцию роста растений.

Объекты исследования – штаммы бактерий родов *Rhodococcus*, *Rahnella*, *Pseudomonas* и *Herbaspirillum*, обладающие способностью к деструкции гербицидов ряда сульфонилмочевины и имидазолинонов (в концентрации 100 ПДК) в диапазоне 18–72 %; штаммы бактерий *Bacillus* с выраженными фитозащитными (диаметр зон подавления роста фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и бактерий рода *Pseudomonas* – 23–28 мм) и ростстимулирующими свойствами, а также способностью к росту в присутствии высоких концентраций гербицидов (100 ПДК). Все штаммы бактерий были выделены из различных образцов почвы, загрязненной гербицидами классов сульфонилмочевины и имидазолинонов.

С целью создания эффективного консорциума было изучено взаимодействие между отобранными штаммами методом перекрестного антагонизма и методом лунок и выяснено, что бактерии *Pseudomonas putida* угнетают рост *Rhodococcus erythropolis*, а бактерии *Pseudomonas putida* – *Rahnella aquatilis*. Штамм *Bacillus subtilis* незначительно задерживает рост штаммов *P. putida* и *R. aquatilis*. Исходя из полученных результатов было разработано два бактериальных консорциума с взаимодополняющими свойствами:

№ 1 (*B. subtilis*, *P. putida*, *H. frisingense*);

№ 2 (*B. subtilis*, *R. aquatilis*, *R. erythropolis*).

В ходе эксперимента по сравнению деструктивной, антимикробной и ростстимулирующей активностей установлено, что наилучшими показателями обладает консорциум № 2: степень деструкции хлоримурон-этила (ХМЭ) и имазамокса (ИМ) составляет 45–82 %, антимикробная активность в отношении фитопатогенов *Fusarium oxysporum* и *Pseudomonas syringae* – 23–28 мм, всхожесть семян редиса (с. Жара) превышает на 25 % контрольные показатели (табл.).

Таблица

Характеристика консорциумов бактерий

Консорциум	Титр КОЕ, ед/мл	Диаметр зоны задержки роста тест-объекта, мм		Всхожесть семян, % к контролю	Степень деструкции гербицидов, %	
		<i>F. oxysporum</i>	<i>P. syringae</i>		ХМЭ	ИМ
№ 1	$(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^9$	23 $\pm$ 1,2	26 $\pm$ 1,5	20	64	21
№ 2	$(6,5 \pm 0,1) \cdot 10^9$	23 $\pm$ 1,0	28 $\pm$ 1,2	25	82	45

Кроме того, показано, что внесение 2 % рабочего раствора консорциума № 2 в жидкую среду Е8 с гербицидами ХМЭ, ИМ (100 ПДК) с последующим культивированием в течение 7 сут., не только снижает содержание гербицидов на 40–80 % по отношению к контролю, но и устраняет фитотоксическое действие их остаточных количеств. Так, обработка семян редиса с. Жара образцом на основе консорциума № 2 повышает в 2,1–2,3 раза их всхожесть и увеличивает в 2 раза длину проростков по сравнению с контролем [Экологическое почвоведение..., 2002, Сэги, 1983].

Эффективность действия консорциума микроорганизмов № 2 подтверждена в модельно-полевых условиях на посевах яровой пшеницы с. Дарья и картофеля с. Криница. Так, на 17-е сутки после обработки посевов пшеницы гербицидами Атон, ВДГ (д. в. тифенсульфурон-метил), Секатор Турбо, МД (д. в. амидосулфурон, йодосулфурон-метил-натрий, мефенпир-диэтил), Кассиус, ВРП (д. в. римсульфурон) и консорциумом № 2 степень разложения гербицидов на 11–26 % превышала показатели контрольного варианта.

Таким образом, отобран эффективный консорциум бактерий (*B. subtilis*, *R. aquatilis*, *R. erythropolis*) с высокими деструктивной, антимикробной и ростстимулирующей активностями. Совокупность изученных свойств консорциума указывает на возможность его использования в качестве основы препарата для биоремедиации почв, загрязненных остаточными количествами гербицидов группы сульфонилмочевины и имидазолинонов, и стимуляции роста растений.

Литература

Экологическое почвоведение: Лабораторные занятия для студентов-экологов : метод. указания / сост. И. Н. Волкова, Г. В. Кондакова ; Яросл. гос. ун-т. Ярославль, 2002. 35 с.

Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М. : Колос, 1983. 253 с.

ВАРИАТИВНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ИОНАМ АЛЮМИНИЯ

Я. В. Пухальский^{1,2}, Н. Е. Кичигина¹, Н. М. Макарова¹,
Т. С. Азарова¹, А. И. Шапошников¹, Н. Ю. Зиновкина,
W. W. Wenzel³, В. И. Сафронова¹, А. А. Белимов¹

¹ ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург – г. Пушкин,
arriam2008@yandex.ru

² ООО НПО «БиоЭкоТех», г. Санкт-Петербург, info@biocotech.ru

³ University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna,
ub.support(at)boku.ac.at

Известно, что микроорганизмы более устойчивы к воздействию стрессов, нежели растения. В частности, среди прочих типичных представителей почвенной и ризосферной микрофлоры, в загрязненных и кислых почв в небольшом количестве могут встречаться клубеньковые бактерии рода *Rhizobium* [Спайнк и др., 2002], обладающие повышенной устойчивостью к токсичным концентрациям тяжелых металлов (ТМ), а также ионам алюминия. Поэтому, при отборе и стратификация рибозий по их внутривидовой устойчивости к широкому спектру токсикантов, необходимо также изучать их симбиотическую активность и вирулентность, поскольку это может иметь дальнейшее целенаправленное использование их адаптационного потенциала в биотехнологиях. Для проведения подобной выборки для экспериментов были использованы 61 штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* *bv.viciae* (ведомственная коллекция ФГБНУ ВНИИСХМ), выделенных из ризосферы гороха различного географического положения и физико-химических свойств. Первичная оценка устойчивости штаммов бактерий к ТМ и ионам алюминия оценивалась визуальным методом по ранее разработанным методикам [Белимов и др., 2004; 2012]. Для этого бактерии были высеваны на агаризованной маннитно-дрожжевой (МД) среде (рН = 6,0 для ТМ и рН = 4,5 для алюминия) с добавлением стерильных растворов солей Cd, Co и Al в виде хлоридов различных концентраций. Культивирование проводилось в течение 5 сут. при 28 °С. Результаты скрининга бактерий с расчетом средних значений по их минимальной токсичной и минимальной летальной концентраций приведены на рисунке. Наибольшая вариабельность для штаммов в общей выборке была выявлена для кадмия. Для более точной дифференцировки наиболее устойчивых штаммов был использован метод периодической культуры с использованием спектрофотометра, при инку-

бации бактерий в жидкой питательной среде с токсичными концентрациями элементов. Оценка интенсивность роста бактерий таким образом оценивалась по значениям оптической плотности. В итоге для дальнейших исследований в полевых условиях и сооружениях закрытого грунта бактерий были ранжированы по группам: обладающие наибольшей устойчивостью к Cd (штаммы 1029 и 1045); одновременно высоко устойчивые к Cd и Co (штаммы 1037, 1041 и 1062); относительно высоко устойчивые к Cd и Co (штаммы 1066 и 1079) и наиболее устойчивые к Al (штаммы 1023, 1031, 1033, 1034, 1038, 1041, 1043, 1049, 1078, 1079 и 1081). В итоге, показано, что штамм под инвентарным номером 1041 обладает устойчивостью сразу ко всем трем элементам.

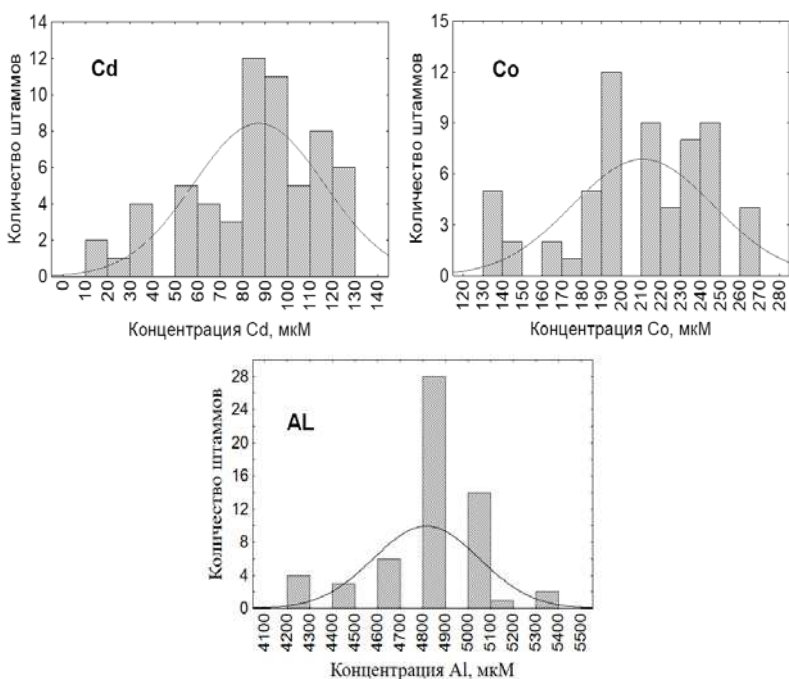


Рис. Распределение штаммов клубеньковых бактерий гороха *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* по устойчивости к тяжелым металлам и алюминию при росте на агаризованной питательной среде. Указаны концентрации, рассчитанные как средние значения их минимальной токсичной и минимальной летальной концентрации.

Выявленные особенности полиморфизма данных штаммов дают возможность создания на их основе биопрепаратов комплексного действия, инокуляция которыми позволит сформировать эффектив-

ные симбиосистемы в растениеводстве с бобовыми культурами [Сытников, 2012; Тихонович и др., 2005]. Их применение способствует увеличению урожайности макросимбионтов и повышению их сопротивляемости к неблагоприятным почвенным условиям, в том числе, за счет активизации процессов биосорбции и иммобилизации токсикантов в ризосфере. Благодаря этому снизится их транслокация и аккумуляция в надземные органы растений. Кроме того, возрастет общая биологическая активность почвенной экосистемы, отвечающая за здоровье и формирующая ее плодородие.

Работа проведена при поддержке грантов РНФ 141600137 и РФФИ 120401501а.

Литература

Белимов А. А. Взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями: роль биотических и абиотических факторов. *Palmarium Acad. Publ.*, 2012. 228 с.

Белимов, А. А., Кунакова А. М., Сафронова В. И., Степанов В. В., Юдкин Л. Ю., Алексеев Ю. В., Кожемяков А. П. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием // *Микробиология*. 2004. Т. 73. С. 118–125.

Спайнк Г., Кондорози А., Хукас П. *Rhizobiaceae*: молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. СПб., 2002. 558 с.

Сытников Д. М. Биотехнология микроорганизмов азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе // *Биотехнология*. 2012. Т. 5(4). С. 34–45.

Тихонович, И. А., Кожемяков А. П., Чеботарь В. К., Круглов Ю. В., Кандыбин Н. В., Лаптев Г. Ю. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. М. : ВНИИСХМ, 2005. 154 с.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РИЗОБАКТЕРИИ В ФИТОРЕМЕДИАЦИИ

Л. Р. Садыкова, Д. К. Благова, З. Р. Вершинина,
Л. Р. Хакимова, А. Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, г. Уфа, e-mail: zilyaver@mail.ru

Одной из главных задач в фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ), является создание эффективных растительно-микробных систем, где симбиотические микроорганизмы будут способствовать накоплению ТМ в растениях-гипераккумуляторах, тем самым способствуя очистке загрязненных территорий. Для повышения фиторемедиационной эффективности подобных систем целесообразна трансформация симбиотических почвенных бактерий, обладающих полезными для растений свойствами, генами фитохелатинов, что потенциально может повысить доступность ТМ для растений.

Большинство фитохелатинов характеризуются присутствием в молекуле гамма-пептидной связи, что усложняет их синтез в клетках. Поэтому для трансформации симбиотических бактерий наиболее перспективным является использование синтетических псевдохелатиновых генов, кодирующих фитохелатины без гамма-пептидной связи, что упрощает синтез данных белков, но, тем не менее, способность связывать ТМ сохраняется.

В данной работе для конструирования и клонирования псевдохелатинового гена *pph6*, были синтезированы соответствующие комплементарные друг другу олигонуклеотидные блоки: P6ph1 и P6ph2. С помощью коротких праймеров P6F и P6R амплифицировали кодирующую часть гена *pph6*. Затем амплифицированную ДНК клонировали в плазмиду pJN105TurboGFP вместо гена флуоресцентного белка *gfp* под управление сильного конститутивного промотора фага T5. В результате была получена векторная конструкция pJN105Turbo-*pph6*. Далее для получения трансформированных штаммов клубеньковых бактерий были выбраны 5 штаммов ризобий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН, обладающих ростостимулирующей активностью по отношению к редьке масличной и амаранту (растения-гипераккумуляторы ТМ): *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2, *R. leguminosarum* VSy3, *R. leguminosarum* VPi106, *R. leguminosarum* VSy12.

Для оценки устойчивости к Cd^{2+} и Ni^{2+} бактерий, экспрессирующих ген псевдохелатина *pph6*, трансформированные и контрольные бактерии культивировались в течение недели при 24°C на твердой УМ среде, содержащей разные концентрации ТМ (0, 100, 200, 300 мкМ). Были получены результаты, показывающие положительное влияние экспрессии гена *pph6* на устойчивость бактерий к воздействию тяжелых металлов. Так бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2, *R. leguminosarum* VPi106 начинали расти на более высоких концентрациях тяжелых металлов, чем контрольные не трансформированные штаммы. Наилучшие результаты по устойчивости были получены для *R. leguminosarum* VSy12 – трансформированный штамм рос при максимальных концентрациях Cd^{2+} и Ni^{2+} , использованных в эксперименте. Практически никакого влияния трансформация геном *pph6* не оказала на устойчивость штамма *R. leguminosarum* VSy3 (табл. 1, 2). В дальнейшем трансформированные штаммы ризобий будут использованы при создании искусственных симбиотических систем для эффективной фиторемедиации.

Таблица 1

Оценка устойчивости к Cd^{2+} бактерий, экспрессирующих ген
псевдофитохелатина *pph6*

Название штамма	0 мкМ	100 мкМ	200 мкМ	300 мкМ
THy1	+	±	—	—
THy1+ <i>pph6</i>	+	+	±	—
THy2	+	±	—	—
THy2+ <i>pph6</i>	+	+	±	—
VPi106	+	—	—	—
VPi106+ <i>pph6</i>	+	±	—	—
VSy3	+	±	—	—
VSy3+ <i>pph6</i>	+	±	—	—
VSy12	+	+	±	—
VSy12+ <i>pph6</i>	+	+	+	+

+ – рост на твердой среде

± – слабый рост на твердой среде

–отсутствие роста на твердой среде

Таблица 2

Оценка устойчивости к Ni^{2+} бактерий, экспрессирующих ген
псевдофитохелатина *pph6*

Название штамма	0 мкМ	100 мкМ	200 мкМ	300 мкМ
THy1	+	±	—	—
THy1+ <i>pph6</i>	+	+	±	—
THy2	+	±	—	—
THy2+ <i>pph6</i>	+	+	±	—
VPi106	+	—	—	—
VPi106+ <i>pph6</i>	+	±	—	—
VSy3	+	+	±	—
VSy3+ <i>pph6</i>	+	+	±	—
VSy12	+	+	±	—
VSy12+ <i>pph6</i>	+	+	+	±

+ – рост на твердой среде

± – слабый рост на твердой среде

–отсутствие роста на твердой среде

*Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта
Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00033
мол _а.*

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СОЗДАНИЮ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЙ ФАГОТЕРАПИИ НА ОСНОВАНИИ ИЗУЧЕНИЯ CRISPR / CAS-СИСТЕМЫ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA UCBPP-PA14*

Л. А. Степаненко¹, Ю. П. Джиоев¹, А. Ю. Борисенко¹,
Ю. А. Маркова², В. И. Злобин¹

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

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск

Pseudomonas aeruginosa – вездесущая грамотрицательная аэробная подвижная бактерия палочковидной формы. Широко распространена в природе: встречается в почве, в воде, на растениях, в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Известна микробиологам как патоген растений, однако является одним из распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций у человека. Это обусловлено наличием факторов патогенности, таких как подвижность, токсинообразование, продукция гидролитических ферментов, и высокой резистентности к действию антибиотиков [Lee, 2004]. Высокая вирулентность патогена позволяет поражать широкий спектр хозяев и обусловлена наличием островов патогенности, которые представляют собой кластеры одного или нескольких генов, постоянно приобретаемые бактерией путем горизонтального переноса [Matteo, 2018].

На современном этапе сочетание геномики и биоинформатики может генерировать новые знания, которые позволят разработать современные подходы в лечении сложных инфекционных заболеваний. CRISPR / Cas-система бактерий, представляет собой тип «врожденного» иммунитета, нацеленного на внедрение чужеродной нуклеиновой кислоты. При проникновении постороннего генетического материала (фаги и плазмиды) участок его последовательности встраивается в виде спейсеров в CRISPR локусы и бактерии приобретают устойчивость к фагам и новые патогенные свойства [Barrangou, 2007; Bolotin, 2005]. Таким образом, становится актуальным изучение CRISPR / Cas-системы бактерий для разработки новых подходов в терапии тяжелых инфекционных заболеваний [Борисенко, 2015].

Цель: дать полную характеристику CRISPR / Cas-системы штамма *Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14* для поиска и анализа

фагов и плазмид через расшифрованные спейсерные последовательности в CRISPR-кассете с целью дальнейшего подбора высокоспецифичных бактериофагов.

Материалы и методы. В качестве объекта была взята геномная последовательность *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 (NC_008463.1), загруженная из базы данных GenBank. Для поиска CRISPR/Cas системы использовались методы программного моделирования MacSyFinder (MacromolecularSystemFinder, ver.1.0.2). Поиск структурных и функциональных характеристик Cas-генов осуществлялся при помощи вспомогательных программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0). Для поиска CRISPR-кассет в геноме использовались онлайн-приложения «CRISPRi: a CRISPR Interactive database». Для поиска фагов, расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение «CRISPR Target: bioinformatic prediction and analysis of CRN targets».

Результаты и обсуждение. В данных исследования была определена и проанализирована полная последовательность генома штамма *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14. Данный клинический изолят PA14 является значительно более вирулентным в широком спектре хозяев, включая мышей, нематоду *Caenorhabditis elegans*, насекомое *Galleria mellonella* и растение *Arabidopsis thaliana* [Lee DG, 2004]. Его геном имеет относительно большой размер (около 6,5 Мб) и содержит 6177 генов. В структуре CRISPR/Cas-системы исследуемого штамма было обнаружено три CRISPR-локуса. Рядом с 2 и 3 локусами обнаружена группа Cas-генов, характерных для CRISPR/Cas-системы Type-I Subtype-I-F. CRISPR-кассета 1 имеет небольшой размер в 156 н. о. и состоит из 2 спейсеров размеров 34 н. о., разделенных повторами в 45 н. о., имеющих несколько замен. Данная кассета располагается достаточно далеко (2375950 н. о.) от CRISPR-локусов 2 и 3, а также от Cas-генов. CRISPR-2, размером 873 н. о., содержит 14 спейсеров размером от 32 до 38 н. о., разделенных консервативными повторами размером 28 н. о. В CRISPR-3 кассете размером 1288 н. о. обнаружен 21 спейсер, размером от 32 до 33 н. о., разделенных повторами в 28 н. о.

Скрининг фагов и плазмид через спейсерные последовательности показал, что в CRISPR-кассете 1 отмечается совпадение первого спейсера с протоспейсером плазмиды pMSHV изолята *Sphingobium herbicidovorans* strain МН, выделенного из почвы, а также с протоспейсером плазмиды p2 *Streptomyces* sp. WISF4, выделенной на ка-

федре растительной медицины, Национального Университета Южной Кореи из ризосферы почвы, содержащей множество почвенных микроорганизмов. В CRISPR-кассетах 2 и 3 установлена полная идентификация спейсеров протоспейсерам фагов и плазмид, специфичных для бактерий семейства *Pseudomonadaceae*. Спейсер 3 CRISPR-2 имеет полное соответствие нуклеотидной последовательности *plasmid* pKPN-704 *Klebsiella pneumoniae* strain KPNH39, выделенной от человека. Интересно отметить, что данный спейсер имеет наибольшее совпадение, с одной заменой, к участку ДНК *plasmid* pE *Xanthomonas citri* CFBP6167, вызывающей бактериальные заболевания *phaseolus vulgaris* (фасоль обыкновенная) и *plasmid* pEC743_4 *Escherichia coli* strain 743, изолированной от человека.

На основании данных исследований можно получать информацию о предполагаемой устойчивости CRISPR/Cas-системы данного штамма к обнаруженным фагам, о патогенных свойствах возбудителя, получаемых с помощью плазмид, об адаптационных возможностях данного штамма, и на основании этого осуществлять подходы к созданию персонифицированной фаготерапии и фагопрофилактики.

Литература.

Борисенко А. Ю., Джигоев Ю. П., Парамонов А. И. и др. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/CAS систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015. Т. 133. № 2. С. 71–74.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // Science. 2007. Vol. 315. P. 1709–1712.

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A. et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. // Microbiology/ – 2005. Vol. 151. P. 2551–2561.

Lee DG, Urbach JM, Wu G. et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial // Genome Biol. 2006. Vol. 7 (10). R90. doi: 10. 1186 / gb-2006–7-10-r90.

Matteo B, Antonio V, Antony C. et al. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections // Drugs Context. 2018. Vol. 7. P. 1–18. doi: 10. 7573/dic. 212527.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОПОТЕНЦИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ПОРОД

А. М. Субботин, С. А. Петров, Л. Ф. Калёнова,
Т. В. Маркевич, М. В. Нарушко, Е. О. Симонова,
Н. О. Ренёв

ТюмНЦ СО РАН, г. Тюмень, e-mail: subbotin.prion@yandex.ru

Из образцов многолетнемёрзлых пород (ММП), отобранных на территории Западной и Восточной Сибири, выделены штаммы жизнеспособных бактерий, на основе которых создана рабочая коллекция. 70 штаммов бактерий идентифицированы методом сиквенса по 16S rRNA, часть из них депонирована в ВКПМ ФГУП ГосНИИ Генетика.

Цель работы. Исследование биологического потенциала микроорганизмов, выделенных из ММП, по их влиянию на морфологические и физиологические показатели растений и животных.

Результаты исследований. Бактериальные суспензии и вторичные метаболиты, полученные на основе микроорганизмов из ММП, исследовались по влиянию на морфофизиологические параметры растений, на репарацию кожной раны у мышей; на репарацию экспериментальной механической эрозии эпителия роговицы глаза у кроликов и на исходы экспериментальной закрытой нейротравмы головного мозга у крыс. При работе с животными соблюдались требования Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации, Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте и для других научных целей (№ 123, 1986 г.), а также приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в РФ».

Изучение влияния предпосевной обработки семян пшеницы штаммами бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus cereus* 875TS, *Bacillus megaterium* 2-06-TS1) показало, что данная обработка семян положительно влияет на энергию прорастания семян и их всхожесть, продуктивность растений, их рост и развитие. Стимулируется развитие корневой системы и работа фотосинтетического аппарата [1]. Так же исследовалось влияние штамма бактерий *Achromobacter spanius* 10–50-TS2 в качестве средства повышения устойчивости растений к хлоридному засолению почвы [2]. Получены положительные результаты. На основе отобранных штаммов перспективна разработка бактериальных препаратов, способствующих повышению продуктивности растений.

При обработке экспериментальной кожной раны у мышей мазевой формой препарата, содержащего бактерии рода *Bacillus*, штамма МЗ *Bacillus sp.* скорость репарации была на 9,1 % быстрее, чем под действием лекарственного препарата «Солкосерил» и 18,2 % быстрее, чем под влиянием плацебо [3].

Нами исследовано влияние препарата, содержащего комплекс вторичных метаболитов штамма бактерий *Serratia fonticola*, выделенного из многолетнемёрзлых пород береговых отложений реки Чара, на репарацию экспериментальной механической эрозии эпителия роговицы глаза [4]. После формирования механической эрозии эпителия роговицы проводили лечение глаз: в контрольной группе глазным гелем «Солкосерил», в опытной группе – препаратом, содержащим вторичные метаболиты бактерий *Serratia fonticola*. Инстилляцию препаратами осуществляли 4 раза в сутки до полной эпителизации дефекта роговицы. Лечение экспериментальной механической эрозии эпителия роговицы глаза у кроликов препаратом, содержащим вторичные метаболиты штамма *Serratia fonticola*, показало, что в опытной группе начало эпителизации по периферии дефекта роговицы отмечается уже через 18 ч (в контроле – через 48), серозное отделяемое исчезло через 48 ч (в контроле – через 96). У 80 % животных опытной группы через 48 ч не отмечается эрозии эпителия роговицы. В контрольной группе, при лечении препаратом «Солкосерил», полное выздоровление травмы роговицы глаза наступает через 120 ч. Таким образом, применение препарата, содержащего вторичные метаболиты штамма *Serratia fonticola*, оказалось более эффективным, чем препарата «Солкосерил».

Комплекс вторичных метаболитов штамма *Serratia fonticola* был так же исследован на способность оказывать влияние на исход экспериментальной закрытой нейротравмы головного мозга у крыс [5]. Комплекс метаболитов вводился внутривентрикулярно, за 10 мин до нанесения закрытой нейротравмы, в количестве 0,015–0,020 мкг белкового компонента в 0,5 мл физиологического раствора. Установлено, что в экспериментальной группе, где вводился комплекс метаболитов штамма *Serratia fonticola*, в течение 21 дня после нанесения закрытой нейротравмы головного мозга отмечалась гибель только 6,67±0,52 % животных. Микроскопические исследования полученных гистологических срезов показали, что в этой группе наблюдаются менее выраженные признаки отёка тканей головного мозга. В контрольных группах гибель животных варьировала от 56,67±9,05 % до 66,67±8,61 % ($p < 0,05$). Таким образом, в экспери-

менте показано, что комплекс вторичных метаболитов штамма *Serratia fonticola* обладает протективным эффектом при закрытой нейротравме головного мозга, и может быть основой для разработки лекарственных препаратов.

Проведённые исследования показали, что микроорганизмы, выделенные из ММП, обладают значительным биологическим потенциалом и могут быть использованы для разработки биотехнологических препаратов на их основе для растениеводства и для медицинского применения.

Работа выполнена по госзаданию, согласно Плану НИР ТюмНЦ СО РАН на 2018–2020 годы, протокол № 2 от 8.12.2017 (Приоритетное направление IX.133. Программа IX.133.1. Проект: IX.133.1.4. Криобиологические процессы на суше и в прибрежной части Карского моря в условиях повышения среднегодовых температур).

Литература

Субботин А. М., Нарушко М. В., Петров С. А. Штамм микроорганизмов *Bacillus megaterium* 2-06-TS1 в качестве активатора фотосинтеза и энергии прорастания растений // патент на изобретение RUS 2627608 27. 06. 2016

Субботин А. М., Петров С. А. Штамм микроорганизмов *Achromobacter spanius*. 10-50-TS2 в качестве средства повышения устойчивости растений к хлоридному засолению // патент на изобретение RUS 2607028 27.06.2016

Калёнова Л. Ф., Новикова М. А., Субботин А. М. Влияние микроорганизмов из вечной мерзлоты на репарацию кожной раны // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158, № 10. С. 480–484.

Субботин А. М., Маркевич Т. В., Петров С. А. Применение препарата, содержащего метаболиты штамма бактерий рода *Bacillus* sp., выделенного из многолетнемерзлых пород, для лечения экспериментальной механической эрозии эпителия роговицы глаза // Точка зрения. Восток – Запад. 2017. № 1. С. 74–76

Мальчевский В. А., Субботин А. М., Немков А. Г., Петров С. А. Влияние инфицированности штаммами микроорганизмов многолетних мерзлых пород на исходы закрытой нейротравмы головного мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 161, № 3. С. 366–368.

БИОДЕСТРУКЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

М. С. Третьякова¹, Л. А. Беловежец², Л. Е. Макарова¹,
М. В. Иванова¹, Ю. А. Маркова¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: marina-tretjakova@yandex.ru

² Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН,
г. Иркутск, e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Нефтяные разливы, происходящие в результате аварийных ситуаций губительны для окружающей среды. При попадании нефти в почву наблюдаются изменения в ее химическом, микробиологическом составе, свойствах и структуре. Прежде всего, происходит нарушение почвенного микробиоценоза, воздухообмена, изменяется состав почвенного гумуса, затрудняется поступление воды, питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности почвенных животных и растений. Почвы теряют свое плодородие и сельскохозяйственное значение [Laffon, 2016; Сулейманов, 2012].

В настоящее время для ликвидации таких последствий используют микробиологические препараты, разработанные на основе аборигенных углеводородоксилирующих микроорганизмов. Применение препаратов позволяет существенно сократить время, стоимость и трудоемкость рекультивационных работ [Fuentes, 2014; Xenia, 2016]. Перспективным при биоремедиации почв является использование штаммов, выделенных из ризосферы растений, в виду их высокого биотехнологического потенциала. Целью работы стало изучение ризосферных микроорганизмов для их применения в биоремедиации нефтезагрязненных территорий.

В результате модельных экспериментов выявлены 6 наиболее перспективных микроорганизмов – нефтедеструкторов, которые были выделены из ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Иркутской области, Заларинского района [Третьякова, 2018]. Штаммы проявили высокую нефтеразлагающую активность в жидкой среде и почве. Убыль нефти за 60 сут. эксперимента составила до 50 % в жидкой минеральной среде в зависимости от концентрации нефти. Показано, что убыль нефти в нефтезагрязненной почве за 60 сут. эксперимента при внесении исследованных штаммов увеличивалась на 20 % относительно контроля и составила 60 % от исходного ее содержания.

Изучены основные пути деструкции ароматических компонентов нефти микроорганизмами. Штаммы разлагали данные компоненты по наиболее распространенному метаболическому пути, через пирокатехин и протокатеховую кислоту.

Установлено, что один из изучаемых штаммов, относящийся к р. *Rhodococcus* проявил фитозащитные свойства и оказался способен снимать негативное воздействие нефти на растения. В эксперименте использовали семена редьки масличной (*Raphanus sativus* var. *Oleiferus* (L.) Sazonova & Stank.), райграса пастбищного, салата Орфей (Гавриш), гороха Щербет (Гавриш), кукурузы Сахарный початок (Гавриш). Было показано, что при обработке семян исследуемых растений суспензией микроорганизмов в концентрации 10^7 КОЕ повышалась всхожесть, длина подземной и надземной части растения, а также масса проростков. Также в растениях, обработанных штаммом р. *Rhodococcus* возрастало содержание хлорофилла *a* и *b*, а также каротиноидов. Установлено, что штамм синтезировал биосурфактанты и фитогормоны.

Таким образом, в результате проделанной работы получены перспективные штаммы – нефтедеструкторы, которые могут быть использованы для создания на их основе микробиологического препарата для рекультивации почв, загрязненной нефтью. Один из штаммов *Rhodococcus erythropolis*, выделенный из ризосферы пырея снижал негативное действие сырой нефти на растения, восстанавливая всхожесть, морфологические параметры проростков, фотосинтетический аппарат растений. В дальнейшем данный штамм перспективен для создания на его основе биоудобрения.

Работа проведена с использованием коллекций микроорганизмов, культур клеток, растений *in vitro* Центра коллективного пользования «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН.

Исследование поддержано грантом РФФИ и Правительства Иркутской области, проект № 17-45-388078 p_a.

Литература

- Laffon B., Pásaro E., Valdiglesias V. Effects of exposure to oil spills on human health: updated review // Journal of Toxicol. Environ Health. Part B. 2016. Vol. 19. P. 105–128.
- Сулейманов Р. Р., Шорина Т. С. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного (Оренбургская область) // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14. № 1. С. 1.
- Fuentes S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications // Applied microbiology and biotechnology. 2014. Vol. 11. P. 4781–4794.
- Xenia M. E., Refugio R. V. Microorganisms metabolism during bioremediation of oil contaminated soils // Journal of Bioremed. Biodegr. 2016. Vol. 7. P. 340.
- Третьякова М. С. Перспективы использования эндо- и ризосферных микроорганизмов для восстановления загрязненных нефтью почв : автореф. канд. дис. Иркутск, 2018.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТАРКТИЧЕСКИХ ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К ПАТОГЕНАМ РАСТЕНИЙ

А. М. Тригубович, А. А. Арашкова, В. Е. Мямин,
К. В. Кантор, А. В. Сидоренко

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск,
e-mail: trigubovich777@gmail.com

В настоящее время мировая практика биологической защиты растений ориентирована на использование бактериальных препаратов. Взаимодействуя с растениями бактерии могут повышать их жизнеспособность и регулировать численность фитопатогенов [Сидорова, 2018]. Следует отметить, что по сравнению с другими продуцентами антимикробных соединений, относительной простотой и технологичностью использования в производстве обладают спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. Описан ряд бацилл, которые используются в качестве агентов биоконтроля – *Bacillus subtilis*, *B. amyloquiefaciens*, *B. megaterium*, *B. mojavensis* и др. Виды рода *Bacillus* обладают супрессивными качествами *in vitro* по отношению более чем к 20 видам фитопатогенных организмов за счет способности продуцировать различные классы соединений (белков, полиенов, поликетонов, циклических липопептидов), проявляющих резко выраженные антимикробные свойства [Сидорова, 2018; Nagorska, 2007].

Целью данной работы был отбор психротолерантных бактерий с высокой антагонистической активностью по отношению к бактериальным и грибным возбудителям болезней овощных культур, сохраняющих активность при пониженных температурах.

Для скрининга бактерий-антагонистов использовали изоляты, выделенные ранее из различных образцов антропогенных материалов, более 20 лет находившихся на территории Восточной Антарктиды и собранных в период 7-й Белорусской антарктической экспедиции (2014–2015 гг.) в регионе работы научно-экспедиционного состава (Земля Эндерби, оазис Холмы Тала, участок Вечерний). Для отбора культур с психротолерантными свойствами, но способными развиваться в широком температурном диапазоне, изоляты культивировали при температуре от 5 до 37°C в течение 2–7 сут. Из более чем 100 изолятов было отобрано 2 культуры рода *Bacillus*, имевших одинаково высокую ростовую активность при низких и высоких температурах. Идентификацию бактерий до вида осуществляли с

помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, сравнивая полученные белковые спектры с референтными из базы данных Bruker Database Version 3.3.1.0. По результатам спектрометрии оба изолята были идентифицированы как представители вида *Bacillus mojavensis*.

Методом отсроченного антагонизма было выявлено, что изоляты *B. mojavensis* обладают выраженной антагонистической активностью к широкому кругу бактериальных (*Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae*) и грибных (*Alternaria alternata*, *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lupini*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Galactomyces geotrichum*, *Phoma beta*) фитопатогенов.

При глубинном культивировании изолятов *B. mojavensis* в колбах на среде с мелассой в качестве источника углерода титр КОЕ на 3-е сутки при 28 °С достигал $6,7 \pm 0,5 \cdot 10^9$ у *B. mojavensis* A1 и $5,2 \pm 0,3 \cdot 10^9$ у *B. mojavensis* A2. Наибольший антимикробный эффект штаммы бактерий *B. mojavensis* проявили по отношению к фитопатогенам *X. campestris*, *P. carotovorum*, *A. brassicae*, *B. cineria*. Установлено, что антимикробная активность полученной культуральной жидкости наблюдается как при 28 °С, так и при 15 °С (табл. 1).

Таблица 1

Антимикробная активность культуральной жидкости штаммов-антагонистов по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам

Штамм-антагонист	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм							
	<i>Pectobacterium carotovorum</i> 20.1		<i>Xanthomonas campestris</i> 2.5		<i>Alternaria brassicae</i> БИМ F-621		<i>Botrytis cineria</i> БИМ F-591	
	15°C	28°C	15°C	28°C	15°C	28°C	15°C	28°C
<i>B. mojavensis</i> A1	18,3	16,0	19,1	23,0	22,6	27,6	22,6	27,6
<i>B. mojavensis</i> A2	24,8	24,1	31,3	30,0	28,8	28,5	28,8	29,2

С помощью специфических праймеров были амплифицированы гены, ответственные за синтез различных антимикробных метаболитов – липопептидов и поликетидов. В результате было установлено, что исследуемые штаммы способны синтезировать довольно широкий круг антимикробных веществ (табл. 2).

Таким образом, благодаря высокой антимикробной активности и способности синтезировать различные биологически активные вещества изученные штаммы *B. mojavensis* обладают потенциалом для создания на их основе биопрепаратов для борьбы с широким кругом возбудителей болезней растений

Таблица 2

Результаты ПЦР для обнаружения генов, отвечающих за продукцию различных классов антимикробных соединений

Штамм-антагонист	Липопептиды			Поликетиды		
	Фенгицин (<i>fen</i>)	Бацилломицин (<i>bac</i>)	Итурин (<i>itu</i>)	Диффицидин (<i>dif</i>)	Макролактин (<i>mac</i>)	Бациллен (<i>bae</i>)
<i>B. mojavensis</i> A1	+	—	+	+	+	+
<i>B. mojavensis</i> A2	+	+	—	+	+	+

Литература

Сидорова Т. М., Асатурова А. М., Хомяк А. И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов // Сельскохозяйственная микробиология. 2018. Т. 53, № 1. С. 29–37.

Nagorska K., Bikowski M., Obuchowski M. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent // Acta Biochimica Polonica. 2007. Vol. 54, N 3. P. 495–508.

ВЛИЯНИЕ КОНСОРЦИУМА МИКРООРГАНИЗМОВ НА РЕПАРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВОГО ПРЕПАРАТА ПРИ ТЕХНИЧЕСКИХ ОЖОГАХ

Т. Б. Тумурова, Д. В. Шалбуев,
С. Н. Лебедева, С. Д. Жамсаранова

¹Восточно-Сибирский государственный университет
технологий и управления,
г. Улан-Удэ, e-mail: tumurova_t@mail.ru

Коллаген, являясь основным строительным белком внеклеточного матрикса, представляет собой динамический и гибкий материал, который участвует в механизмах регуляции роста и восстановления тканей [Balaure et al., 2019]. Экзогенный коллаген способен образовывать волокна с высокой прочностью на разрыв и стабильностью, за счет способности к сшиванию и самоагрегации [Chattopadhyay, Raines, 2014]. Являясь природным полимером, он биоразлагаем, нетоксичен и слабо антигенен, образует различные комплексы с лекарственными веществами.

Поэтому в последнее время коллагенсодержащие препараты получили широкое направление в разработке носителей для внедрения лекарственных средств. Предложенный инновационный метод полу-

чения коллагенового препарата, заключается в применении микробиоценоза молочнокислых микроорганизмов, органических кислот и ферментов, продуцируемых ими.

Изучение противоожогового действия проводили на модели термического ожога [Парамонов, 2002]. И за сутки до моделирования ожога на боковой поверхности тела крысы проводили удаление видимой надкожной части волос (4×4 см) путем выстригания медицинскими ножницами. Ожог проводили стеклянной пробиркой с внутренним диаметром 22 мм (площадь сечения 4 см²) и длиной 20–25 см, заполненной горячей водой и помещали ее вертикально в кипящую воду (100 °С) на 2/3 высоты, прогревали в течение 1 мин с последующим плотным контактом с оголенным участком кожи на 10 с. Образующиеся в результате ожоги III степени имели округлую форму, дно ран было ярко-красным, и отмечалась гиперемия шириной 0,5–0,8 см. Моделирование ожога осуществляли под легким эфирным наркозом, согласно требованиям Международного этического комитета по экспериментам на лабораторных животных [Каркищенко, 2003].

Животные были разделены на 5 групп по 8 особей в каждой: 1-я – интактные; 2-я – контрольная (животные после моделирования ожога); 3-я – группа сравнения, у которой раны обрабатывались мазью «Левомеколь» (производство «Нижфарм», Россия); 4-я – опытная 1 (животные после моделирования ожога и обработанные коллагеновым препаратом – 1); 5-я – опытная 2 (животные после моделирования ожога и обработанные коллагеновым препаратом 2).

Для определения репаративных свойств, проводили забор гистологического материала и исследовали морфометрические данные ран после ожога на 13-е сутки.

Коллагеновый препарат 1, полученный согласно технологии разработанной на кафедре «Технология кожи, меха. Водные ресурсы и товароведение» [патент № 2486258, 2013 г.]. Коллагеновый препарат 2, полученный с использованием в процессе растворения молочной кислоты

Обработку ран проводили у групп 3, 4 и 5. Крыс 3-й группы – мазью «Левомеколь», 4-й группы обрабатывали коллагеновым препаратом 1 и 5-й группы – коллагеновым препаратом 2. Объем наносимого препарата был 0,5–1 г на всю площадь раны обработку проводили 1 раз в день.

Таблица

Морфометрические данные ран крыс после ожога на 13-е сут. заживления

	Толщина эпидермиса (мкм)	Толщина дермы (мкм)	Толщина эпидермиса\дермы (мкм)	Толщина грануляционной ткани (мкм)	Фибробласты дермы	Лейкоцитарно-некротический струп	Эпителий волосяных фолликул
Группа 1	485,59±24,92	2039,4±104,60	2544,2±64,70	Не обра-зуются	37,67±1,09	Не обра-зуются	11,70±0,34
Группа 2	260,53±9,55	1093,90±40,37	1306,67±80,14	1177,95±53,53	13,83	162,23±23,26	Не обра-зуются
Группа 3	356,08±15,49	1495,52±65,06	1851,60±40,27	2018,19±30,57	21,17±1,14	191,78±29,68	11,01±1,27
Группа 4	340,87±9,60	1456,86±40,33	1781,71±56,02	2153,80±63,57	28,50±0,57	181,33±6,31	11,45±1,11
Группа 5	349,61±12,27	1468,36±51,45	1890,89±85,18	2383,8±47,89	33,33±0,92	260,15±16,75	8,43±0,69

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Морфометрические данные показали, что на 13-е сутки эксперимента образование грануляционной ткани и фибробластов дермы наиболее выражено у групп 4 и 5, обработанных коллагеновыми препаратами 1 и 2 соответственно. У группы 4, обрабатываемой коллагеновым препаратом 1, образуется больше эпителий волосяных фолликул, чем у группы 5 обрабатываемой коллагеновым препаратом 2. Таким образом, коллагеновый препарат 1, полученный по инновационной технологии, проявляет характерные ранозаживляющие свойства.

Литература

- Balaure P. C., Holban A. M., Grumezescu A. M. et al. *In vitro* and *in vivo* studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds // International Journal of Pharmaceutics. 2019. Vol. 557. p. 199–207.
- Chattopadhyay S, Raines R. T. Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing // Biopolymers. 2014. Vol. 101, N 8. P. 821–833.
- Парамонов Б. А., Чеботарев В. Ю. Методы моделирования термических ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 134, № 11. С. 593–597.
- Каркищенко Н. Н. Лабораторные животные (положение и руководство). М. : Межакад. изд-во «ВПК», 2003. 138с.
- Патент РФ № 2486258. Способ получения продуктов растворения коллагена. Жарникова Е. В., Шалбуев Д. В. Оpubл. 27.06.2013. Бюл. № 18.

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ-ПРОДУЦЕНТОВ КАРОТИНОИДОВ В ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ (РОССИЯ, КАРЕЛИЯ)

**К. А. Чеканов, А. А. Кублановская,
Т. А. Федоренко, Е. С. Лобакова**

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
г. Москва, e-mail: chekanov@mail.bio.msu.ru

Каротиноиды – пигменты терпеноидного ряда, имеющие большое практическое значение. Они широко используются как компоненты косметических, лекарственных средств, биологически активных добавок, кормов для животных. Одноклеточные зеленые водоросли (микроводоросли) – основной источник натуральных каротиноидов. Некоторые представители микроводорослей способны в больших количествах накапливать данные пигменты внутри клеток в ответ на стрессовые воздействия. Среди индукторов синтеза каротиноидов: яркий свет, дефицит минерального питания, высыхание, повышенная соленость среды и т. д. Существующие штаммы микроводорослей, которые используются для промышленного получения каротиноидов, характеризуются рядом недостатков, среди которых низкая скорость роста и низкая устойчивость к контаминациям. Поэтому поиск новых штаммов с лучшими биотехнологическими характеристиками по-прежнему является актуальной задачей.

В рамках данной работы в прибрежной зоне Кандалакшского залива Белого моря изолировали 18 штаммов каротиногенных водорослей. Наиболее подробно данные микроорганизмы описаны для более южных широт. Однако полярные и субполярные области представляются перспективным источником штаммов каротиногенных микроводорослей за счет сочетания в этих регионах целого ряда неблагоприятных факторов, к которым устойчивы такие микроорганизмы. Штаммы микроводорослей изолировали из одиночных колоний на твердых средах в отсутствие органических источников углерода и азота. Идентификацию штаммов проводили путем анализа последовательности ядерного рибосомального кластера генов, включающей ген 5,8SrRNA и внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) 1 и 2. Дополнительно исследовали особенности вторичной структуры ITS2. Путем тонкослойной хроматографии было проведено разделение пигментов для изучения соотношения между различными группами каротиноидов в клетках. Исследуемые штаммы

относились к видам зеленых водорослей *Haematococcus lacustris*, *H. rubicundus* and *Bracteacoccus cohaerens* (два последних описаны для этого региона впервые). Штаммы рода *Haematococcus* в стрессовых условиях накапливали кетокаротиноид астаксантин. *B. cohaerens* накапливал β -каротин в качестве преобладающего каротиноида.

Исследуемые штаммы могут быть потенциально использованы для получения природных каротиноидов.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕМЕДИАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА В МЕСТАХ СКЛАДИРОВАНИЯ ПРОДУКТОВ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ КИСЛЫХ ГУДРОНОВ

Н. В. Шеховцова¹, А. Н. Меркурьев¹, С. Д. Тимрот²

¹Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова,
г. Ярославль, e-mail: ninval@mail.ru

²Ярославский государственный технический университет,
г. Ярославль, e-mail: stimrot@yandex.ru

Широкое распространение предприятий нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности привело практически к повсеместной проблеме загрязнения природной среды углеводородами нефти. Для Ярославской области большое значение имеет проблема ликвидации кислуглеродных прудов Ярославского нефтеперерабатывающего завода имени Д. И. Менделеева. Это предприятие было основано в 1879 году для производства смазочных масел. Технология их получения включала перегонку мазута и очистку масляных дистиллятов серной кислотой, что приводило к образованию кислого гудрона. Со времени основания завода кислый гудрон накапливался в хранилищах открытого типа – специальных прудах, которые расположены на территории предприятия. Одна из реализованных технологий заключается в нейтрализации кислого гудрона негашеной известью и использовании полученного продукта в качестве инертного материала для строительства. Однако полученный материал оказался недостаточно инертным, сохранил токсические свойства, поэтому был возвращен в освободившиеся пруды-накопители. В связи с тем, что технологии переработки кислых гудронов не дали качественных продуктов для вторичного их использования, актуальным является определение возможности биоремедиации этой зоны «накопленного экологического ущерба».

Цель настоящей работы – провести рекогносцировочное исследование по выявлению некоторых тривиальных экологотрофических групп микроорганизмов, участвующих в процессе почвообразования: сапротрофов, олиготрофов и азотфиксаторов.

Объектами исследования служили 3 пробы, отобранные 30.10.2018 из поверхностного слоя (0–10 см) прудов-накопителей. Между первой и второй точками было выдержано расстояние около 30 м для исключения отбора одной партии продукта после нейтрализации и оценки ее равномерности. Проба 3 была отобрана из корнеобитаемого слоя на участке с признаками развития травянистой растительности на привнесённом условно плодородном грунте.

Определение pH проб проводили в солевой и водной вытяжках согласно ГОСТ 26583-85 и ГОСТ 26423-85 соответственно. Микроорганизмы выделяли рутинным методом чашечного посева на селективные питательные среды [Практикум..., 2005]. Численность сапротрофов определяли посевом на МПА, олиготрофов – с помощью МПА, разбавленного в 10 раз (МПА 1:10), а численность азотфиксаторов на среде «Azotobacter Agar» фирмы Himedia следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1,00; $MgSO_4$ – 0,2; $NaCl$ – 0,2; $FeSO_4$ – следы; почвенный экстракт – 5,00; маннитол – 20,00; агар-агар – 15,00.

Результаты количественных определений приведены в таблице. Значение pH заметно варьирует в разных пробах. Актуальная кислотность проб (pH водной вытяжки) находится в зоне щелочных значений, в то время как обменная кислотность (pH солевой вытяжки с KCl) попадает в нейтральную область ($pH > 6$) и возможно в данном случае свидетельствует об избытке негашеной извести в грунте [Смирнов, 1984]. Численность всех групп микроорганизмов закономерно увеличивается по мере понижения актуальной кислотности пробы, что особенно наглядно проявляется на примере азотфиксаторов.

Таблица.

Химические и микробиологические параметры продукта нейтрализации кислых гудронов из места его складирования

№ пробы	pH вытяжки		Численность микроорганизмов, КОЕ/г		
	водной	солевой	сапротрофы	олиготрофы	азотфиксаторы
1	8,58	7,99	$3,82 \cdot 10^4$	$9,00 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^4$
2	7,92	7,85	$7,57 \cdot 10^4$	$7,92 \cdot 10^4$	$1,11 \cdot 10^5$
3	7,64	7,55	$1,75 \cdot 10^5$	$2,40 \cdot 10^6$	$4,46 \cdot 10^6$

Низкая численность сапротрофов 10^4 – 10^5 КОЕ/г во всех пробах свидетельствует о дефиците легкоусвояемого органического вещества (ОВ) в продуктах нейтрализации кислых гудронов. Количество олиготрофных микроорганизмов достоверно выше числа сапротрофов исключительно в ризосферной пробе 3. Это можно объяснить стимулирующим эффектом низкомолекулярных продуктов фотосинтеза, которые поступают в ризосферу с корневыми выделениями растений. Подобный же эффект наблюдается в пробах 2, 3 при внесении в питательную среду низкомолекулярных органических соединений в виде маннитола (Azotobacter Agar). Таким образом, полученные результаты в целом согласуются с известными закономерностями экологии микроорганизмов [Экология..., 2017]. Исключением в данном случае является проба 1. Ингибиторное воздействие на микроорганизмы щелочной реакции среды проявляется в отсутствии достоверной разницы в численности разных экологотрофических групп. Микроскопические исследования показали, что среди микроорганизмов, выделенных на МПА и МПА 1:10, преобладали спорообразующие и актинобактериальные формы. Последние, как и азотфиксаторы, часто находились в ассоциации с дрожжами. Известно, что среди спорообразующих, актинобактериальных форм, а также дрожжей и плесневых грибов много углеводородокисляющих видов [Практикум ..., 2005].

Полученные результаты позволяют сделать положительный прогноз по поводу решения проблемы снижения накопленного экологического ущерба за счет разработки способа ремедиации прудовнакопителей продукта нейтрализации кислых гудронов негашеной известью. В дальнейшем предполагается оценить эффективность как биостимуляции, так и биоаугментации.

Литература

- Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
Смирнов П. М., Муравин Э. А. Агрохимия. М. : Колос, 1984. 304 с.
Экология микроорганизмов / под общ. ред. А. И. Нетрусова. М. : Юрайт, 2017. 267 с.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Азарова Т. С. 9, 191
Акимова Е. С. 4, 47
Аксёнов-Грибанов Д. В. 8, 180
Александрова Г. П. 5, 85
Андреева И. С. 8, 173
Арашкова А. А. 3, 9, 35, 204

Б

Баймиев Ал. Х. 4, 10, 47, 133, 193
Баймиев Ан. Х. 3, 4, 10, 47, 193
Баулина О. И. 6, 7, 103, 150
Безматерных К. В. 4, 38
Белимов А. А. 9, 191
Беловежец Л. А. 3, 9, 12, 202
Белых О. И. 4, 7, 8, 50, 111, 137, 157, 167
Биланенко Е. Н. 4, 5, 41, 52, 93
Благова Д. К. 9, 193
Божко К. Н. 4, 58
Бондаренко С. А. 4, 5, 41, 52, 93
Борзенков И. А. 3, 22
Борисенко А. Ю. 9, 196
Будаева В. В. 8, 177
Букин С. В. 4, 5, 43, 96
Бурцева О. И. 6, 103
Быбин В. А. 7, 146
Бынина М. П. 7, 140, 157

В

Ваганова А. Н. 6, 128
Васильева У. А. 8, 180
Верхозина В. А. 4, 45
Верхозина Е. В. 4, 45

Верхотуров В. В. 4, 45
Вершинина З. Р. 4, 7, 9, 10, 143, 193
Викчижанина Д. А. 4, 52
Вишневская Н. А. 7, 131
Владимирова А. А. 4, 10, 47

Г

Георгиева М. Л. 4, 5, 41, 52, 93
Галачьянц А. Д. 4, 6, 7, 50, 111, 157
Галачьянц Ю. П. 6, 101
Ганнесен А. В. 3, 22
Гисматулина Ю. А. 8, 177
Гладких А. С. 8, 164,
Гладышева Е. К. 8, 177
Глянько А. К. 6, 107
Голубев С. Н. 5, 75
Гончарова И. А. 3, 35
Гончарова А. М. 7, 145
Горшкова А. С. 2, 14
Граскова И. А. 3, 5, 7, 8, 16, 85, 146, 185
Гроза Н. В. 4, 52
Гуменко Р. С. 4, 47
Гуревич А. Л. 3, 19

Д

Данилова О. Я. 4, 5, 52, 93
Данчинова Г. А. 6, 122
Денисова Т. П. 5, 88
Джиоев Ю. П. 9, 196
Дрюккер В. В. 3, 14
Дульцева Н. М. 6, 98
Дьякова А. В. 5, 85

Е

Еникеев А. Г. 6, 125

Еськова А. И. 8, 170

Ж

Жамсаранова С. Д. 9, 206

Жариков А. Н. 8, 177

Живетьев М. А. 7, 146

Журина М. В. 3, 22

З

Зайцев Б. Н. 8, 173

Зайцева Ю. В. 6, 109

Закабунин А. И. 8, 173

Захаренко А. С. 4, 6, 53, 101

Земская Т. И. 4, 5, 43, 53, 69, 96, 98, 101

Зименс Е. А. 4, 5, 55, 91

Зиновкина Н. Ю. 9, 191

Злобин В. И. 9, 196

И

Иванов В. Г. 4, 43, 53, 69

Иванова М. В. 9, 202

Изосимова О. Н. 6, 111

Ищенко А. А. 6, 114

К

Калёнова Л. Ф. 9, 199

Калмычков Г. В. 6, 101

Кантор К. В. 9, 204

Каракотов С. Д. 4, 58

Каримов И. Ф. 4, 60

Кашеева Е. И. 8, 177

Кириченко К. А. 7, 146

Кичигина Н. Е. 9, 191

Козлов С. Н. 8, 162

Кокорина Л. А. 5, 88

Коломиец Э. И. 9, 188

Кондратьева Л. М. 3, 7, 24, 152

Кондрашова К. С. 4, 60

Корнева А. В. 4, 8, 63, 162

Коробов В. П. 4, 63

Краснова М. Е. 8, 180

Краснопеев А. Ю. 8, 167

Крутикова В. О. 3, 24

Крюкова О. В. 5, 65, 67

Кублановская А. А. 6, 7, 9, 103, 150, 209

Куликалова Е. С. 8, 162

Куликова Н. А. 4, 60

Курамшина З. М. 6, 8, 117, 183

Л

Лавина А. М. 7, 143

Лапкина Е. З. 6, 120

Латышев Н. В. 5, 67

Лебедева С. Н. 9, 206

Лемкина Л. М. 4, 63

Литвиненко З. Н. 3, 7, 24, 152

Лобакова Е. С. 6, 7, 9, 103, 150, 209

Лойко Н. Г. 3, 27

Ломакина А. В. 5, 69

Ломоватская Л. А. 7, 145

Ляпун И. Н. 7, 154

Ляпунова Н. А. 6, 122

М

Мазепа А. В. 8, 162

Макарова Л. Е. 5, 9, 72, 202

Макарова Н. М. 9, 191

Максимова Е. Н. 5, 88

Максимова Л. А. 6, 125

Мандрик-Литвинкович М. Н. 9, 188

Маракаев О. А. 6, 109

Маркевич Т. В. 9, 199

Марков Е. Ю. 8, 162

Маркова Ю. А. 3, 7, 9, 12, 146, 196, 202

Мартъянов С. А. 3, 22

Масленникова С. Н. 4, 58

Матосова Е. В. 7, 8, 140, 154, 170

Меркурьев А. Н. 9, 210

Механикова И.В. 5, 96
Миронова Г. Ф. 8, 177
Миронова Л. В. 8, 164
Мориц А. С. 5, 72
Морозов И. В. 6, 101
Мулюкин А. Л. 3, 27
Муратова А. Ю. 3, 5, 29, 75
Мямин В. Е. 9, 204

Н

Нарушко М. В. 9, 199
Неустроев М. П. 5, 78
Николаев В. Б. 8, 162
Николаев Ю. А. 3, 27
Новикова А. С. 4, 5, 43, 80
Ножкина О. А. 5, 8, 85, 185

О

Ованесян А. П. 5, 82
Октябрьский О. Н. 4, 8, 38, 159
Орловская П. И. 9, 188

П

Павлова О.Н. 5, 80
Панферова Ю. А. 6, 128
Переляева Е. В. 8, 180
Перфильева А. И. 5, 8, 85, 185
Петров С. А. 9, 199
Петрова Д. П. 5, 69
Плакунов В. К. 3, 22
Погодаева Т. В. 4, 5, 6, 43, 69, 98, 101
Подлесная Г. В. 4, 6, 7, 8, 50, 111, 157, 167
Полюдова Т. В. 4, 63
Пономарева А. Л. 8, 170
Потапов С. А. 8, 167
Протасов Е. С. 8, 180
Пухальский Я. В. 9, 191
Пьянков В. Ф. 5, 65, 67

Р

Раков А. В. 8, 170
Ренёв Н. О. 9, 199
Рожко Т. В. 5, 65
Рязанова О. С. 7, 140, 154
Романенко А. С. 7, 145
Рябчикова Е. И. 8, 173

С

Садыкова Л. Р. 9, 193
Самойлова З. Ю. 8, 159
Саттарова Л. Р. 6, 8, 117, 183
Сафронова В. И. 9, 191
Семёнов А. А. 6, 125
Сидоров А. В. 6, 109
Сидоренко А. В. 9, 204
Симаков А. В. 8, 173
Симонова Е. В. 5, 88
Симонова Е. О. 9, 199
Ситникова Т. Я. 5, 96
Скиба Е. А. 8, 177
Смирнова Г. В. 4, 8, 38, 159
Соляникова И. П. 3, 27
Сороковикова Е. Г. 7, 137
Степаненко Л. А. 9, 196
Столяр С. В. 5, 82
Струнникова О. К. 7, 131
Субботин А. М. 9, 199
Сузина Н. Е. 3, 27
Сунгурцева И. Ю. 5, 75
Суслова М. Ю. 7, 157
Суханова Е. В. 4, 5, 8, 55, 91, 167
Сухов Б. Г. 5, 85,
Сынгеева А. К. 8, 162

Т

Тарабукина Н. П. 5, 78
Теремова М. И. 3, 19
Терёшина М. В. 4, 5, 52, 93
Тимофеев М. А. 8, 180
Тимрот С. Д. 9, 210
Тимченко Н. Ф. 8, 170

Тирранен Л. С. 5, 6, 82, 120
Тихонова И. В. 4, 7, 8, 50, 137, 167
Токаревич Н. К. 6, 128
Третьякова М. С. 3, 9, 12, 202
Тригубович А. М. 3, 9, 35, 204
Трофимов Б. А. 5, 85
Тумурова Т. Б. 9, 206
Турковская О. В. 3, 5, 29, 75
Тюленев А. В. 4, 38

Ф

Федоренко Т. А. 6, 9, 103, 209
Федотова И. С. 8, 164
Филинова Н. В. 6, 114
Фрейлихман О. А. 6, 128

Х

Хайруллин Р. М. 6, 8, 117, 183
Хакимова Л. Р. 7, 143
Хальзов И. А. 5, 96
Ханаева Т. А. 5, 80
Хаснатинов М. А. 6, 122

Ц

Цыренов В. Ж. 3, 32

Ч

Чеканов К. А. 6, 7, 9, 103, 150, 209
Черницына С. М. 5, 6, 69, 98

Ш

Шадрина О. С. 3, 24
Шалбуев Д. В. 9, 206
Шапошников А. И. 7, 9, 131, 191
Шафикова Т. Н. 6, 125
Шахназарова В. Ю. 7, 131
Швец К.Ю. 7, 133
Шеховцова Н. В. 9, 210
Штыкова Ю. Р. 7, 8, 157, 167
Шубенкова О. В. 6, 101

Э

Эль-Регистан Г. И. 3, 27

Я

Яковлев А. А. 8, 170
Януцевич Е. А. 4, 5, 52, 93

W

Wenzel W. W. 9, 191

Научное издание

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

ISBN 978-5-9624-1718-9

Материалы публикуются в авторской редакции

Подготовка материалов к печати:

Л. А. Максимова, Л. А. Беловежец, А. Г. Еникеев, А. Л. Турская

Дизайн обложки: Ю. А. Розимова

Подписано в печать 31.05.2019. Формат 60×90 1/16

Усл. печ. л. 13,5. Тираж 50 экз. Заказ 210

Издательство ИГУ; 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124