

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, номер 5, 2018

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Регуляция натрийуретическими пептидами формирования моновидовых и бинарных биопленок бактерий микробиоты кожи *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*
А. В. Ганнесен, О. Лезуатье, А. И. Нетрусов, В. К. Плакунов, М. Ж. Ж. Фейоле 469
- Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* SP245
А. В. Шелудько, Ю. А. Филипьева, Е. М. Телешева, А. М. Буров, С. С. Евстигнеева, Г. Л. Бурыгин, Л. П. Петрова 483
- Эффект ионов легких металлов и хлорида на активность умеренно-термофильных ацидофильных железобактериальных микроорганизмов
А. Г. Булаев, А. Н. Чернышов 495
- Особенности строения и биологические свойства липополисахарида *Herbaspirillum seropedicae* Z78
Н. С. Величко, А. К. Суркина, Ю. П. Федоненко, Э. Л. Здоровенко, С. А. Коннова 511
- Экзометаболиты грибов рода *Penicillium*, выделенных из различных экосистем высоких широт
Т. В. Антипова, В. П. Желифонова, Б. П. Баскунов, Г. А. Кочкина, С. М. Озерская, А. Г. Козловский 519
- Повышение активности карбогидраз эндо-деполимеразного действия в штамме *Trichoderma reesei* с помощью мутагенеза
Е. В. Костылева, Н. В. Пурикова, А. С. Середа, И. А. Великорецкая, Т. Н. Веселкина, Н. С. Лобанов, И. А. Шашков, А. П. Синицын 530
- Paracoccus simplex* sp. nov. — новый факультативный метилотроф, использующий метиламин
Н. В. Доронина, Е. Н. Капаруллина, А. А. Чемодурова, Ю. А. Троценко 541
- Methylophilus aquaticus* sp. nov. — новая аэробная метилотрофная бактерия, выделенная из пресного водоема
Е. Н. Капаруллина, Н. В. Агафонова, Ю. А. Троценко, Н. В. Доронина 551
- Структура микробных матов в прибрежных районах Мраморной бухты (Крымский полуостров)
Н. В. Пименов, А. Ю. Меркель, И. Ю. Тарновецкий, Т. В. Малахова, О. С. Самылина, Т. А. Канапацкий, Е. Н. Тихонова, М. А. Власова 561
- Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики — эффективные продуценты антибиотиков
Т. А. Ефименко, О. В. Ефременкова, Е. В. Демкина, М. А. Петрова, И. Г. Сумарукова, Б. Ф. Васильева, Г. И. Эль-Регистан 573
- Биоразнообразие почвенных углеводородоокисляющих бактерий из разных климатических зон
М. И. Чернявская, А. А. Букляревич, Я. А. Делеган, А. Э. Охремчук, А. Е. Филонов, М. А. Титок 581

МИНИОБЗОР

- Хитозан в биологии, микробиологии, медицине и сельском хозяйстве
В. П. Варламов, И. С. Мысякина 595

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Устойчивость к хитозану бактерий и микромицетов, различающихся по способности к продукции внеклеточных хитиназ и хитозаназ

Г. Э. Актуганов, В. Р. Сафина, Н. Ф. Галимзянова, Л. Ю. Кузьмина, Е. А. Гильванова, Т. Ф. Бойко, А. И. Мелентьев

599

Антибактериальные свойства и цитотоксичность бетаинированных производных олигохитозана

И. В. Благодатских, О. В. Вышиванная, А. В. Александрова, Е. А. Безродных, П. В. Зеленихин, С. Н. Куликов, В. Е. Тихонов

610

Влияние изомерной формы аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность ее солей с хитозаном

Н. О. Гегель, И. В. Зудина, О. Н. Малинкина, А. Б. Шиповская

618

Действие хитозана на развитие микроспоридий *Nosema apis* в медоносных пчелах

Е. С. Салтыкова, Л. Р. Гайфуллина, М. Д. Каскинова, А. Р. Гатауллин, Р. Т. Матниязов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко

624

ХРОНИКА

Памяти Г. И. Наумова

631

Contents

Vol. 87, No. 5, 2018

Experimental Articles

- Regulation of Formation of Monospecies and Binary Biofilms by Human Skin Microbiota Components, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, by Human Natriuretic Peptides
A. V. Gannesen, O. Lesouhaitier, A. I. Netrusov, V. K. Plakunov, and M. G. J. Feuilloy 469
- Characterization of Carbohydrate-Containing Components of *Azospirillum brasilense* Sp245 Biofilms
A. V. Shelud'ko, Yu. A. Filip'echeva, E. M. Telesheva, A. M. Burov, S. S. Evstigneeva, G. L. Burygin, and L. P. Petrova 483
- Effect of Light Metal Ions and Chloride on Activity of Moderately Thermophilic Acidophilic Iron-Oxidizing Microorganisms
A. G. Bulaev and A. N. Chernyshov 495
- Structural Peculiarities and Biological Properties of the Lipopolysaccharide from *Herbaspirillum seropedicae* Z78
N. S. Velichko, A. K. Surkina, Y. P. Fedonenko, E. L. Zdorovenko, and S. A. Konnova 511
- Exometabolites of the Penicillium Fungi Isolated from Various High-Latitude Ecosystems
T. V. Antipova, V. P. Zhelifonova, B. P. Baskunov, G. A. Kochkina, S. M. Ozerskaya, and A. G. Kozlovskii 519
- Enhancement of Activity of Carbohydrases with Endo-depolymerase Action in *Trichoderma reesei* Using Mutagenesis
E. V. Kostyleva, N. V. Tsurikova, A. S. Sereda, I. A. Velikoretskaya, T. N. Veselkina, N. S. Lobanov, I. A. Shashkov, and A. P. Sinit'syn 530
- Paracoccus simplex* sp. nov., a New Methylamine-Utilizing Facultative Methylotroph
N. V. Doronina, E. N. Kaparullina, A. A. Chemodurova, and Yu. A. Trotsenko 541
- Methylophilus aquaticus* sp. nov., a New Aerobic Methylotrophic Bacterium Isolated from a Freshwater Environment
E. N. Kaparullina, N. V. Agafonova, Yu. A. Trotsenko, and N. V. Doronina 551
- Structure of Microbial Mats in the Mramornaya Bay (Crimea) Coastal Areas
N. V. Pimenov, A. Yu. Merkel, I. Yu. Tarnovetskii, T. V. Malakhova, O. S. Samylina, T. A. Kanapatskii, E. N. Tikhonova, and M. A. Vlasova 561
- Bacteria Isolated from Antarctic Permafrost Are Efficient Antibiotic Producers
T. A. Efimenko, O. V. Efremenkova, E. V. Demkina, M. A. Petrova, I. G. Sumarukova, B. F. Vasil'eva, and G. I. El'-Registan 573
- Biodiversity of Hydrocarbon-Oxidizing Soil Bacteria from Various Climatic Zones
M. I. Charniauskaya, A. A. Bukliarevich, Ya. A. Delean, A. E. Akhremchuk, A. E. Filonov, and M. A. Titok 581

Mini-Reviews

- Chitosan in Biology, Microbiology, Medicine, and Agriculture
V. P. Varlamov and I. S. Mysyakina 595
-

Experimental Articles

- Chitosan Resistance in Bacteria and Micromycetes Differing in Ability to Produce Extracellular Chitinases and Chitosanases
G. E. Aktuganov, V. R. Safina, N. F. Galimzianova, L. Yu. Kuz'mina, E. A. Gilvanova, T. F. Boyko, and A. I. Melent'ev 599

Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Betainated Oligochitosane Derivatives <i>I. V. Blagodatskikh, O. V. Vyshivannaya, A. V. Alexandrova, E. A. Bezrodnykh, P. V. Zelenikhin, S. N. Kulikov, and V. E. Tikhonov</i>	610
Effect of Ascorbic Acid Isomeric Forms on Antibacterial Activity of Its Chitosan Salts <i>N. O. Gegel', I. V. Zudina, O. N. Malinkina, and A. B. Shipovskaya</i>	618
Effect of Chitosan on Development of Nosema apis Microsporidia in Honey Bees <i>E. S. Saltykova, L. R. Gaifullina, M. D. Kaskinova, A. R. Gataullin, R. T. Matniyazov, A. V. Poskryakov, and A. G. Nikolenko</i>	624

Chronicle

G. I. Naumov	631
--------------	-----

РЕГУЛЯЦИЯ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ ФОРМИРОВАНИЯ МОНОВИДОВЫХ И БИНАРНЫХ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ МИКРОБИОТЫ КОЖИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

© 2018 г. А. В. Ганнесен^{a, b, c, *}, О. Лезуатье^c, А. И. Нетрусов^a, В. К. Плакунов^b, М. Ж. Ж. Фейоле^c

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^bФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, Россия

^cЛаборатория микробиологии, сигналинга и микроокружения (Laboratoire de microbiologie signaux et microenvironnement LMSM EA4312), Университет Руана, Эврё, Франция

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

Поступила в редакцию 16.01.2018 г.

Впервые показано, что натрийуретические пептиды А- и С-типа оказывают разнонаправленное влияние на рост моновидовых и бинарных биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*. Эффект натрийуретических пептидов на микроорганизмы зависит от условий культивирования: при 37°C рост моновидовых биопленок *S. epidermidis* стимулируется, а *S. aureus* – ингибируется, что выражается в изменении толщины и биомассы биопленок. При 33°C эффект натрийуретических пептидов на *S. epidermidis* меняется на противоположный. В бинарной биопленке при 37°C натрийуретические пептиды способны увеличивать конкурентную способность *S. epidermidis* в отношении *S. aureus*. Эффект натрийуретических пептидов проявляется в первую очередь для биопленок и в меньшей степени для планктонных культур, что позволяет говорить о натрийуретических пептидах как о молекулах, регулирующих взаимоотношения организма человека и кожной микробиоты.

Ключевые слова: натрийуретические пептиды, биопленки, бинарные биопленки, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, регуляция формирования биопленок

DOI: 10.1134/S0026365618050099

В настоящее время ежегодно во всем мире публикуется множество статей, посвященных микробиоте кожи человека и важности ее взаимодействия с хозяином. Микробиота кожи – это сложное сообщество микроорганизмов, тесно связанных друг с другом и с тканями человека (Chiller et al., 2009; Belkaid et al., 2014; Prescott et al., 2017). Одним из широко распространенных комменсалов кожи человека является *Staphylococcus epidermidis*, предпочитающий влажные участки кожи и обитающий как на поверхности кожи (Grise et al., 2009), так и внутри полостей кожных желез и волосяных фолликулов (Grise et al., 2009, Laureano et al., 2014). *S. epidermidis* является условным патогеном, который в одних случаях может приносить пользу организму человека (или, по крайней мере, не наносить ему вреда) (Christensen, Bruggemann, 2014), а в других – быть причиной инфекций (Sandvik et al., 2013, Sabate Bresco et al., 2017). Близким ему видом является *Staphylococcus aureus*, который, по всеобщему признанию, является более опасным и агрессивным микроорганизмом, ассоциированным

с заболеваниями кожи (Brown et al., 2013). Тем не менее, существуют данные, пока еще неоднозначные, что у некоторой части населения *S. aureus* может быть компонентом нормальной микробиоты кожи (Feuerstein et al., 2017). Тем не менее, эти два близких вида могут вступать в тесные взаимоотношения, и входят в состав мультивидовых сообществ – биопленок (Vandecandelaere et al., 2017). Биопленки – сообщества микроорганизмов, погруженные во внеклеточный матрикс (Николаев, Плакунов, 2007), – могут быть причиной многих заболеваний в организме человека, в том числе биопленки *S. aureus* (Matard et al., 2013) и *S. epidermidis* (Otto, 2012). Тем не менее, есть свидетельства того, что *S. epidermidis* может вызывать защитный эффект, вступая в конкуренцию с *S. aureus* (Iwase et al., 2010, Sugimoto et al., 2013) и модифицируя метаболические процессы *S. aureus* в составе биопленок (Vandecandelaere et al., 2017).

Одним из способов преодоления заболеваний, вызываемых кожной микробиотой, является воз-

действие антимикробных веществ. В связи с постепенным исчерпанием ресурсов антибиотиков перспективен поиск новых соединений, которые могли бы влиять на мультивидовые биопленки в организме человека с целью регуляции их роста. Интерес представляют не только хорошо известные антимикробные соединения неантибиотической природы, которые вырабатываются, в том числе, организмом человека (например, дефензины), но и вещества, не обладающие прямым антимикробным действием и, следовательно, реже вызывающие возникновения резистентных к ним форм микроорганизмов. Известно, что *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* обладают рецепторами адреналина, норадrenalина и других гормонов человека, которые способны регулировать ряд процессов у бактерий: рост, синтез токсинов, формирование пилей и т.д. (Hughes, Sperandio, 2008). Не только гормоны эндокринной системы оказывают значительный эффект на микробиоту человека. Один из основных нейропептидов кожи — вещество P, который синтезируется в нервных окончаниях кожных нейронов (Severini et al., 2002), — в большой степени вовлечен в регуляцию ряда процессов у представителей микробиоты кожи *S. aureus* и *S. epidermidis*. У золотистого стафилококка в присутствии вещества P повышается синтез стафилококкового энтеротоксина С2, а у эпидермального стафилококка усиливается рост биопленок (N'Diaye et al., 2016). Рецептором вещества P у стафилококков является фактор элонгации EF-Tu (N'Diaye et al., 2016). Помимо этого, вещество P, а также нейропептид Y и ряд других нейропептидов обладают антибактериальным эффектом в отношении *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (El Karim et al., 2008).

Особый интерес представляют натрийуретические пептиды (НУП). Различают три типа НУП: А-тип (atrial natriuretic peptide, ANP), В-тип (В-type, brain natriuretic peptide, BNP) и С-тип (C-type, cardiac natriuretic peptide, CNP) (Potter et al., 2009). Ранее было показано, что CNP влияет на синтез токсинов *P. aeruginosa* (Blier et al., 2011). CNP и BNP в некоторой степени подавляют синтез пиоцианина (Blier et al., 2011), модифицируют синтез липополисахаридов (Veron et al., 2007) у *P. aeruginosa*, а также увеличивают цитотоксичность *Pseudomonas fluorescens*, что, по-видимому, связано с вовлечением НУП в процессы синтеза циклических нуклеотидов (Veron et al., 2007; Veron et al., 2008). У *P. aeruginosa* выявлен рецептор CNP — амидаза С-типа (Rosay et al., 2015). НУП синтезируются в разных клетках человеческого организма и циркулируют по кровотоку, а значит, оказывают воздействие на микробиоту кожи в областях скопления кровеносных капилляров. Таким образом, будучи обитателями полостей кожных желез, эти два микроорганизма подвергаются по-

стоянному воздействию НУП, что может влиять на их рост и образование биопленок, а как следствие — на общее состояние кожи.

Целью данной работы было исследовать влияние НУП на рост планктонных культур, а также моновидовых и бинарных биопленок *S. epidermidis* и *S. aureus* в условиях культивирования, моделирующих разные физиологические состояния кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, выращивание и подготовка культур. Штаммы *S. epidermidis* MFP04 и *S. aureus* MFP03 выделены с кожи здоровых добровольцев, а затем охарактеризованы методами протеомики (MALDI-TOF) и секвенированием 16S-рибосомальной РНК (Hillion et al., 2013). Длительное хранение культур осуществляли при -80°C . Для проведения экспериментов высевали размороженные культуры на чашки Петри с агаризованным лизогенным бульоном (lysogenic broth, LB) и инкубировали при 37°C . Из полученных отдельных колоний выращивали суточные культуры в жидкой среде LB при 37°C . Затем получали подготовленный посевной материал — клетки отмывали дважды стерильным физиологическим раствором хлорида натрия (ФР) и доводили им же суспензию клеток до конечной оптической плотности равной 1, при длине волны 580 нм и длине оптического пути 1 см.

Натрийуретические пептиды. Исследовали два натрийуретических пептида (НУП): человеческий пептид А-типа — ANP (“Alfa Aesar”, США) молекулярной массой 3080.47 г/моль и человеческий пептид С-типа — CNP (“PolyPeptide”, Швеция) молекулярной массой 2196.1 г/моль. Вначале готовили исходные растворы пептидов: в фабричную склянку с пептидом добавляли стерильную воду MilliQ (MQ). Молярная концентрация исходного раствора ANP составляла 1.623×10^{-4} М, исходного раствора CNP — 4.554×10^{-4} М. Исходные растворы разделяли на аликвоты в 500-мкл пробирках Eppendorf и хранили при -20°C . Основываясь на литературных данных относительно физиологической концентрации пептидов в организме человека (Edwards et al., 1988; Stingo et al., 1992), а также концентраций НУП, используемых в работе с эукариотическими клетками (Klinger et al., 2013), исследовали три концентрации каждого пептида: 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} М, а также смесь пептидов при концентрации каждого 10^{-6} М. Непосредственно перед засевом культуры в питательную среду добавляли исходный раствор пептида либо растворы, полученные путем разведения исходного раствора в 10 и 100 раз (для получения концентраций 1×10^{-7} и 1×10^{-8} М соответственно).

Анализ динамики роста культур в присутствии НУП. Динамику роста моновидовых культур ис-

следовали в системе Bioscreen C (Финляндия) в 100-луночных иммунологических планшетах типа Honeycomb (“Grow Curves”, США). В лунки вносили растворы НУП, после чего добавляли питательную среду – триптон-соевый бульон (ТСБ) с добавлением глюкозы 0.25% по массе. Конечный объем жидкости в лунке – 200 мкл. Затем вносили заблаговременно подготовленный посевной материал в количестве 15–20 мкл на лунку с таким расчетом, чтобы конечная оптическая плотность смеси при длине волны 580 нм была около 0.08–0.1. Культуры выращивали в течение 24 ч в аэробных условиях, проводя измерения оптической плотности каждые 15 мин. Для изучения влияния условий культивирования (с целью моделирования разных физиологических состояний кожи) культуры выращивали при двух температурах – 37°C (соответствующая стандартной лабораторной практике, а также температуре кожи в случае воспалительных процессов) и 33°C (средняя температура кожи лица (Ariyaratnam, Rood, 1990)). Часть лунок оставляли незасеянными в качестве отрицательного контроля, другую часть лунок засеивали без добавления пептидов (положительный контроль). Анализировали время удвоения клеток и константу скорости роста в присутствии пептидов, длину лаг-фазы, константу отмирания клеток и максимальную ОП как показатель урожая клеток.

Исследование формирования биопленок методом окрашивания кристаллическим фиолетовым. Влияние НУП на формирование моновидовых биопленок определяли по классической методике (O’Toole, 2011) с модификациями. По истечении срока инкубации планшетов с культурами в системе Bioscreen планктонную культуру удаляли, биопленки на дне и стенках планшетов трижды промывали ФР, высушивали при 60°C в течение 15 мин, затем фиксировали 96% этанолом при комнатной температуре 20 мин. По окончании фиксации спирт удаляли, биопленки высушивали при 60°C и окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового (КФ, окрашивает как бактериальные клетки, так и матрикс биопленок) в течение 20 мин. По завершении окрашивания раствор КФ сливали, лунки промывали шесть раз дистиллированной водой, после чего связанный биопленкой краситель экстрагировали 200 мкл 96% этанола в течение часа. Оптическую плотность экстракта измеряли при $\lambda = 600$ нм в системе Bioscreen. Результат выражали в процентном отношении испытуемого образца с НУП к необработанному пептидами контролю.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Изменения структуры моновидовых биопленок под действием НУП исследовали при помощи КЛСМ-микроскопа LSM 710 (“Zeiss”, ФРГ). Биопленки получали в 24-луночных планшетах с плоским стеклянным дном Sep-

soplate (“Geiner bio-one”, Германия) по методике Coylene et al. с изменениями. Планшеты со стеклянным дном широко применяются для работы с КЛСМ, поскольку используемое в них стекло не обладает собственной флуоресценцией в рабочем диапазоне лазеров КЛСМ, в отличие от пластиков (Piruska et al., 2005). Краткое описание: подготовленные посевной материал в объеме 300 мкл вносили в лунки и выдерживали 2 ч при комнатной температуре (предварительная адгезия клеток). Затем удаляли жидкость, лунки промывали дважды стерильным ФР для удаления неприсоединенных клеток, после чего одну лунку фиксировали 96% этанолом (контроль предварительной адгезии). В лунки (кроме фиксированной) вносили среду ТСБ с глюкозой с заранее добавленными пептидами или без их добавления (контроль). Планшеты инкубировали при 37°C или при 33°C в течение 24 ч в стационарных условиях, после чего жидкость сливали и дважды промывали лунки ФР для удаления неприсоединенных клеток. Затем окрашивали неспецифичным флуоресцентным ДНК-красителем SYTO 9 Green (“Molecular probes (Thermo Fisher Scientific)”): фабричный раствор красителя в ДМСО разводили в 1000 раз и полученный раствор в объеме 300 мкл вносили в лунки (в том числе в зафиксированную). Окраску производили в темноте в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего жидкость удаляли и промывали лунки дважды ФР. Затем в лунки добавляли 1–2 капли фиксирующей жидкости Prolong Diamond Antifade Mountant (“Molecular probes (Thermo Fisher Scientific)”) и оставляли на ночь в темноте при 4°C. Образцы анализировали при длине волны лазера 488 нм с иммерсионным объективом 63×/1.4. Управление микроскопом и получение файлов данных из образцов вели в программном пакете Zen 2009 (“Carl Zeiss”, Германия). Обработку полученных данных вели в пакете ImageJ в плагине Comstat2 (при помощи программных вычислительных алгоритмов), с помощью которого определяли два параметра: среднюю толщину биопленок в мкм и среднее распределение биомассы на единицу площади (в мкм³/мкм²). Результаты представляли в виде процентных величин относительно положительного контроля (без добавок), который принимали за 100%. Параметры вычислялись автоматически: плагин использовал цифровые данные собственных файлов-изображений, полученных непосредственно в ПО Zen2009.

Исследование влияния НУП на соотношение бактерий двух видов и метаболическую активность клеток в бинарных культурах и биопленках. В стерильные стеклянные пробирки с винтовыми крышками помещали по 6 мл ТСБ с глюкозой и по два круглых стекловолоконных фильтра Whatman GF/F диаметром 21 мм (“Sigma”), предварительно стерилизованных автоклавированием при

1 атм. Фильтры размещали вдоль стенок пробирки так, чтобы они были на одном уровне по высоте, полностью покрыты средой и не соприкасались. Затем в пробирки добавляли в нужном количестве пептиды (контрольная — без добавок). Подготовленный посевной материал разбавляли стерильным ФР до ОП₅₈₀ 0.5 и вносили в пробирки в количестве 100 мкл. В экспериментах одновременно исследовали и сравнивали бинарные и моновидовые культуры и биопленки. Из посевного материала немедленно делали высевы на чашки Петри с агаризованной средой ТСБ для подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Число КОЕ посевного материала использовали в последующих расчетах прироста числа КОЕ в биопленках и суспензионных культурах. Через 24 ч инкубации при 37°C в аэробных условиях на качалке при 150 об./мин фильтры извлекали, споласкивали в стерильном ФР для удаления незакрепленных клеток. Для подсчета КОЕ в биопленках фильтры помещали в пробирку с 5 мл стерильного ФР, измельчали стеклянной палочкой, размешивали с помощью аппарата вортекс (“VWR”, США) в течение 1 мин (для диспергирования биопленок) и производили рассев на чашки Петри для подсчета КОЕ. Волокна фильтров в данном случае служили абразивом, способствовавшим разрушению агрегатов клеток биопленок. Часть фильтров с биопленками после промывания использовали для измерения метаболической активности клеток. Параллельно измеряли оптическую плотность (ОП) планктонной культуры при $\lambda = 580$ нм и производили рассевы для подсчета КОЕ планктонной культуры каждого образца. Колонии на чашках Петри различали по цвету (*S. aureus* MFP03 — желтоватые, *S. epidermidis* MFP04 — белесые колонии). Результаты подсчета КОЕ отражали на диаграммах в виде числа КОЕ, а также как разницу в приросте числа КОЕ, выраженном в изменении десятичного логарифма ($\Delta \lg$), между исходным числом КОЕ в объеме посевного материала, внесенного в пробирку, и числом КОЕ в жидкой фазе (для планктонных культур) и на фильтре (для биопленок). Анализируя величину числа КОЕ и прироста числа КОЕ, определяли общее количество клеток в планктонных культурах и зрелых биопленках и характер воздействия штаммов друг на друга.

Определение метаболической активности клеток производили по ранее описанной методике (Плакунов и соавт., 2016). Фильтры помещали в лунки 24-луночного иммунологического планшета, после чего в каждую лунку вносили по 2 мл 0.2% раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) — метаболизруемого красителя, способного акцептировать электроны от клеточных НАДФ-Н оксидоредуктаз, превращаясь при этом в нерастворимый

синий формазан. Фильтры окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего отмывали от раствора красителя дистиллированной водой и экстрагировали формазан 2 мл ДМСО на каждый фильтр. ОП раствора измеряли при $\lambda = 595$ нм. ОП экстракта формазана хорошо коррелирует с количеством метаболически активных клеток в биопленке (Плакунов и соавт., 2016), поэтому ее принимали за показатель жизнеспособности клеток в биопленке и использовали для выявления возможных цитотоксических эффектов НУП.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили как минимум в трех статистических повторностях. Достоверность различий определяли методами непараметрической статистики (непараметрический критерий Манна–Уитни). За значимые принимали различия при значении $p < 0.05$ (на рисунках отмечены звездочкой). Расчеты и построение графиков производили в программном пакете Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам экспериментов, представленным на рис. 1, константы скорости роста моновидовых культур у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 оказались практически идентичны: при 37°C в контроле 0.6 и 0.69 ч⁻¹, а времена удвоения — 61 и 69 мин соответственно. Константы скорости отмирания в контроле при 37°C у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 были 0.009 и 0.05 ч⁻¹ соответственно. Максимальные показатели оптической плотности у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 при 37°C также были близкими и находились в диапазоне ОП₅₈₀ от 0.9 до 1 (по золотистому стафилококку данные на рисунке не показаны). НУП не оказывали заметного эффекта на параметры роста обеих культур: лишь в случае *S. epidermidis* добавление ANP в концентрации 10⁻⁶ М незначительно увеличивало время удвоения (до 89 мин), уменьшало константу скорости роста (до 0.63 ч⁻¹) и уменьшало константу скорости отмирания (до 0.06 ч⁻¹). Длина лаг-фазы при 37°C во всех случаях в присутствии НУП не изменялась и составляла 1 ч у *S. aureus* MFP03 и 1.8 ч у *S. epidermidis* MFP04.

При 33°C ситуация несколько изменялась: константы скорости роста в контроле у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 были 0.63 и 0.69 ч⁻¹ соответственно (времена удвоения 63 и 67 мин соответственно). Константа скорости отмирания *S. epidermidis* MFP04 в контроле при 33°C составляла 0.04 ч⁻¹. У *S. aureus* MFP03 в течение 24 ч инкубации фаза отмирания не начиналась. Длительность лаг-фазы несколько увеличивалась по сравнению с 37°C — до 1.5 ч у *S. aureus* MFP03 и до 2 ч

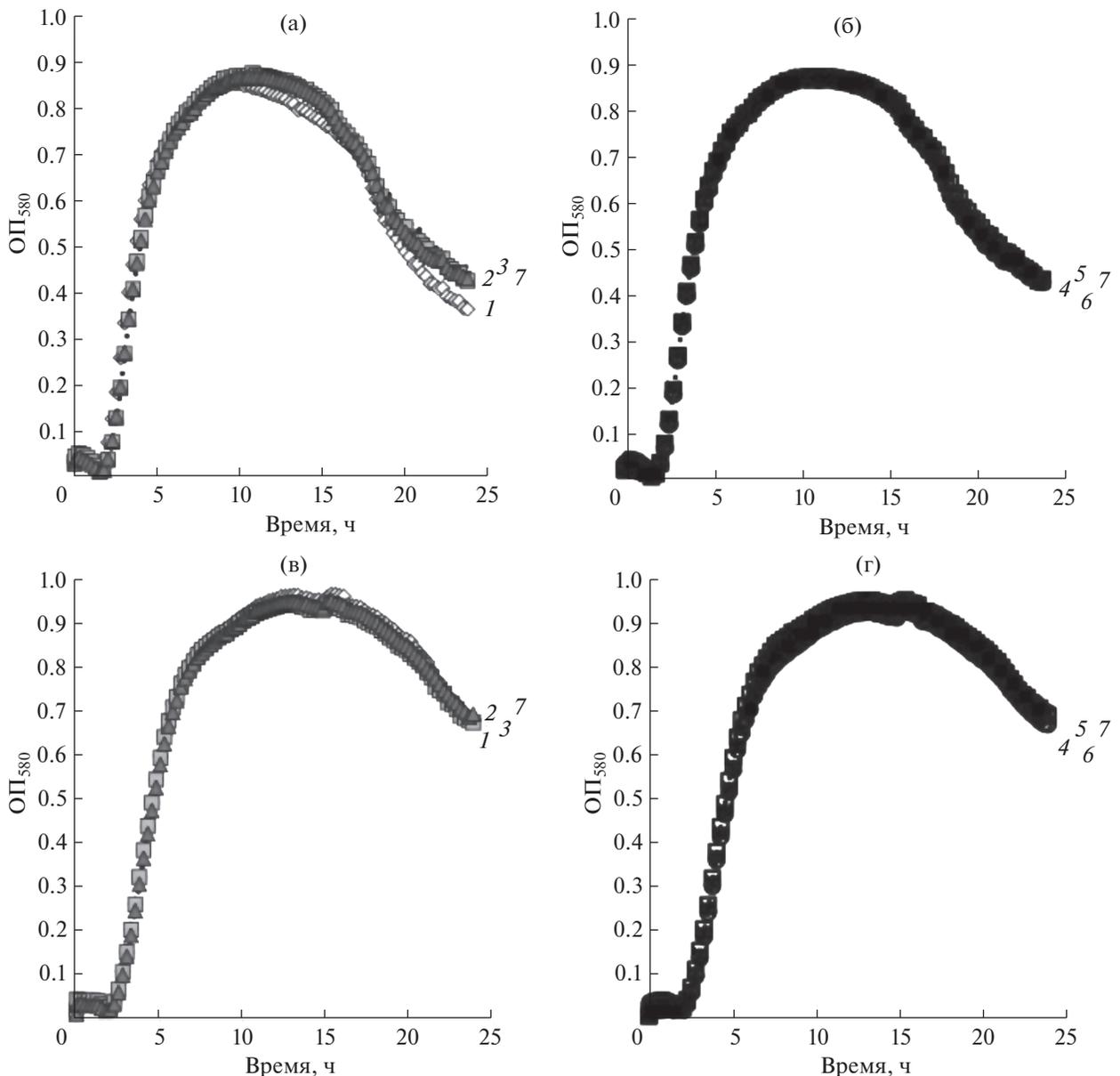


Рис. 1. Влияние ANP и CNP на рост культур *S. epidermidis* MFP04 в зависимости от условий культивирования. Параметры кривых роста: а – рост в присутствии ANP при 37°C; б – рост в присутствии CNP при 37°C; в – рост в присутствии ANP при 33°C; г – рост в присутствии CNP при 33°C. Маркеры: 1 – ANP 1×10^{-6} М; 2 – ANP 1×10^{-7} М; 3 – ANP 1×10^{-8} М; 4 – CNP 1×10^{-6} М; 5 – CNP 1×10^{-7} М; 6 – CNP 1×10^{-8} М; 7 – контроль без НУП. * – $p < 0.05$.

у *S. epidermidis* MFP04. Максимальные ОП, как и при 37°C, лежали в диапазоне 0.9–1.0. Добавление НУП ни в одной из концентраций не изменяло параметров роста обоих микроорганизмов. Это вполне согласуется с результатами ранее опубликованных работ, выполненных на других микроорганизмах (Veron et al., 2008; Rosay et al., 2015).

Оба НУП оказывали заметное влияние на формирование моновидовых биопленок изучаемых бактерий, причем характер этого воздей-

ствия существенно зависел от условий культивирования (рис. 2).

Рост биопленок *S. epidermidis* MFP04 при 37°C стимулировался НУП (рис. 2а): наибольший эффект ANP проявлялся при концентрации 1×10^{-7} М, при этом максимальный рост достигал 129% от контроля. CNP во всех исследованных концентрациях несколько стимулировал рост биопленок, но наиболее выраженная стимуляция наблюдалась при его концентрации 1×10^{-6} М, когда рост составлял 115% от контроля. Напротив, рост биопленок *S. aureus* MFP03 подавлялся обоими

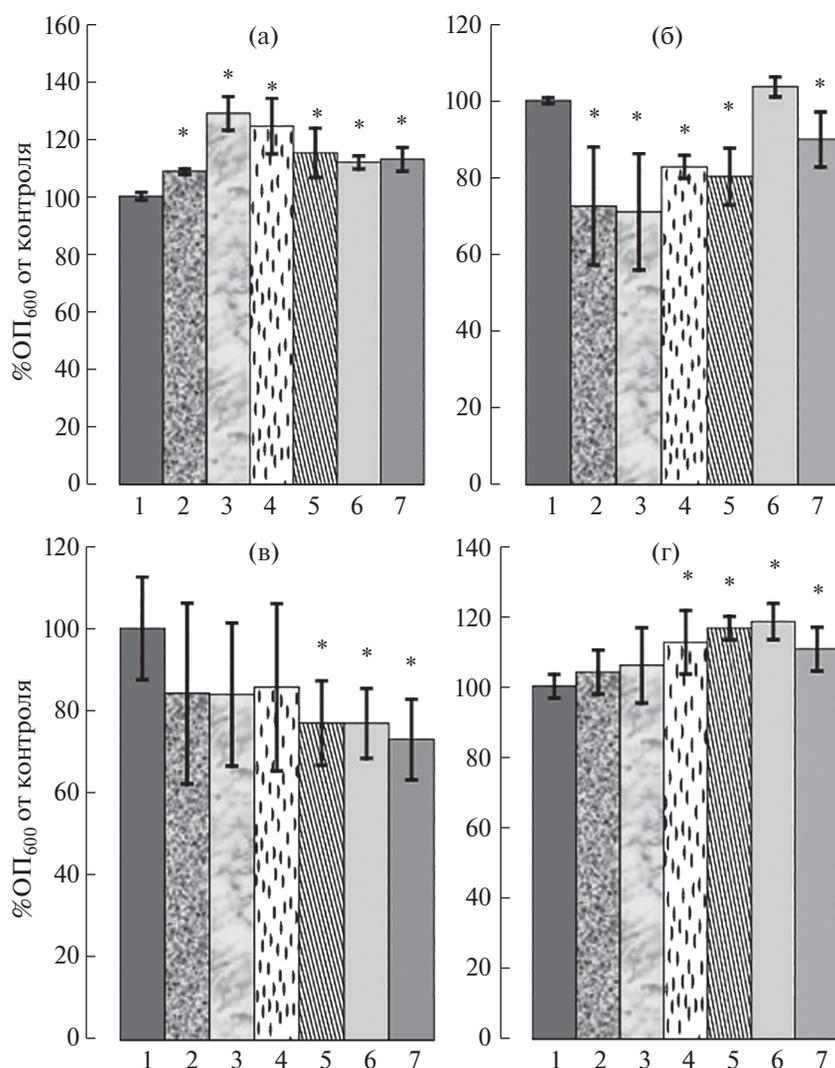


Рис. 2. Влияние ANP и CNP на рост моновидовых биоленок *S. epidermidis* MFP04 и *S. aureus* MFP03. Окрашивание КФ. а – биоленки *S. epidermidis* MFP04 при 37°C; б – биоленки *S. aureus* MFP03 при 37°C; в – биоленки *S. epidermidis* MFP04 при 33°C; г – биоленки *S. aureus* MFP03 при 33°C. Обозначения маркеров 1–7 как на рис. 1.

НУП (рис. 2б): ANP в наибольшей степени ингибировал рост биоленок *S. aureus* MFP03 в концентрации 1×10^{-7} М – до уровня 71% от контроля, а CNP сильнее всего подавлял рост при концентрации 1×10^{-6} М (80% от контроля).

При понижении температуры культивирования до 33°C эффект НУП на рост биоленок обоих микроорганизмов изменялся на противоположный: *S. epidermidis* MFP04 в присутствии обоих пептидов формировал биоленки слабее, чем в контроле (рис. 2в). Если в случае ANP эффект был невелик и приблизительно одинаков во всем диапазоне концентраций (рост порядка 84% от контроля), то CNP ингибировал рост биоленок сильнее, особенно при концентрации 1×10^{-8} М

(рост 73% от контроля). В случае *S. aureus* MFP03 (рис. 2г): с понижением концентрации ANP наблюдался стимулирующий эффект, который, достигал максимума при 1×10^{-8} М (рост 112% от контроля). CNP также достоверно стимулировал рост биоленок при всех концентрациях с максимумом при концентрации 1×10^{-7} М (рост 111% от контроля). На основе анализа данных по окраске биоленок КФ и данных о динамике роста культур можно предположить, что изменения в динамике роста при добавлении НУП связаны, в первую очередь, с ослаблением биоленкообразования и, как следствие, снижением светорассеяния биоленками, растущими на дне лунок.

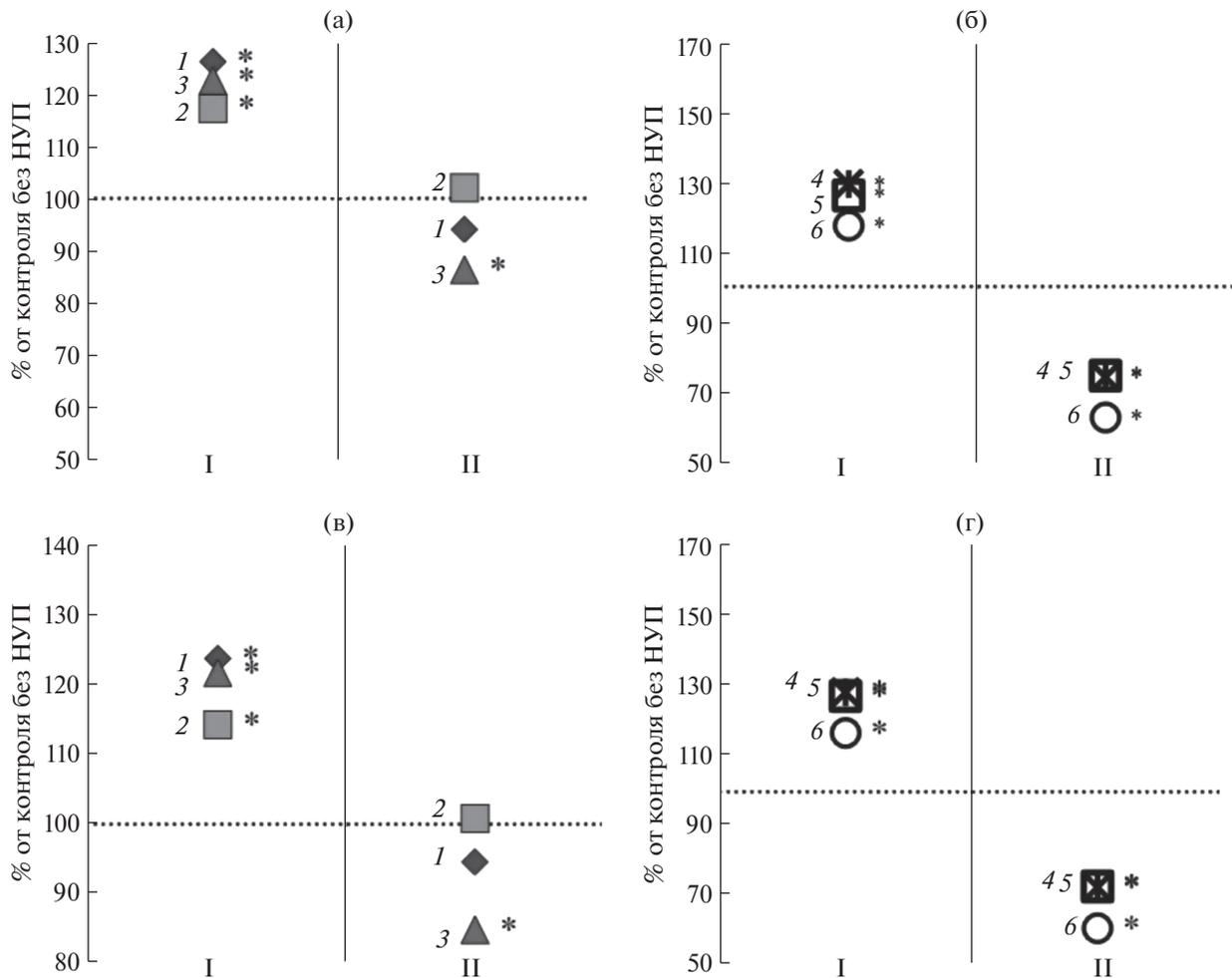


Рис. 3. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: эффекты ANP и CNP на моновидовые биопленки *S. epidermidis* MFP04 при разных условиях культивирования. Контроль – биопленка без добавления НУП (пунктирная линия 100%). Характеристики биопленок: а – изменения плотности биомассы биопленок в присутствии ANP; б – изменения средней толщины биопленок в присутствии CNP; в – изменения биомассы биопленок в присутствии ANP; г – изменения средней толщины биопленок в присутствии CNP. Условия культивирования: I – 37°C, II – 33°C. Обозначения маркеров 1–6 как на рис. 1; пунктирная линия – контроль без НУП. * – $p < 0.05$.

Результаты окрашивания биопленок КФ были подтверждены путем анализа данных КЛСМ (рис. 3 и 4). У *S. epidermidis* MFP04 в присутствии НУП при 37°C значительно увеличивались плотность биомассы (рис. 3а – 1, 3б – 1) и средняя толщина биопленок (рис. 3в – 1, 3г – 1). Плотность биомассы в контроле равнялась 23.52 мкм³/мкм², а средняя толщина – 24.7 мкм. При добавлении ANP во всех исследованных концентрациях наблюдали увеличение плотности биомассы, максимальное при концентрации 10⁻⁶ М (до 29 мкм³/мкм² или 125.8% от контроля), а также средней толщины, также максимальное при концентрации 10⁻⁶ М (до 30.3 мкм или до 123% от контроля). CNP оказывал сходное стимулирующее воздействие при 37°C: плотность биомассы и средняя толщина

биопленок в наибольшей степени возрастали при концентрации CNP 10⁻⁷ М (до 30.3 мкм³/мкм² или 129% и до 31.7 мкм или 128% соответственно).

При понижении температуры культивирования *S. epidermidis* MFP04 до 33°C воздействие НУП приобретало противоположный, ингибиторный характер (рис. 3а–3г; 2). Если в контроле плотность биомассы и средняя толщина составляли 16.83 мкм³/мкм² и 16.93 мкм соответственно, то при добавлении ANP наблюдали снижение обоих параметров, максимально выраженное при концентрации ANP 10⁻⁸ М (плотность биомассы – 14.5 мкм³/мкм² или 86% от уровня контроля, и средняя толщина – 14.4 мкм или 84.9% от уровня контроля). CNP также снижал плотность

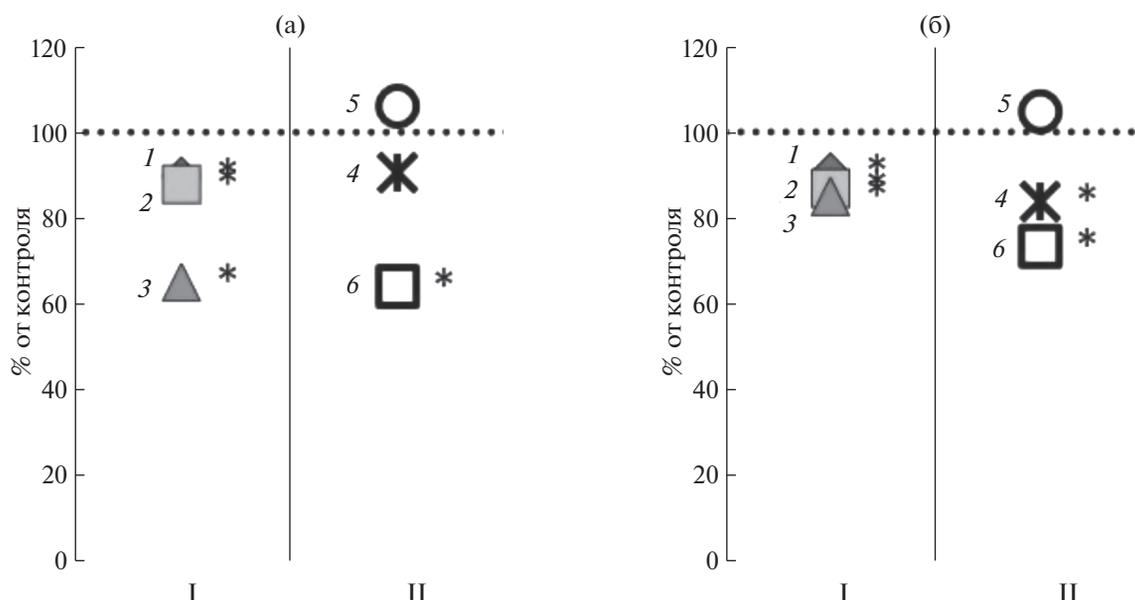


Рис. 4. Влияние ANP и CNP на рост моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03 при 37°C. Контроль – биопленка без добавления НУП (пунктирная линия 100%). Характеристики биопленок: а – изменения плотности биомассы; б – изменения средней толщины. Добавляемые НУП: I – ANP, II – CNP. Обозначения маркеров 1–6 как на рис. 1. * $p < 0.05$.

биомассы и среднюю толщину биопленок *S. epidermidis* MFP04. Максимальный эффект наблюдали при концентрации 10^{-7} М, когда плотность биомассы снижалась до $12.5 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ (уровень 74.2% от контроля), а средняя толщина – до 10.31 мкм (60.9% от контроля).

У *S. aureus* MFP03 при 37°C наблюдали противоположную картину: в присутствии НУП средняя толщина, и плотность биомассы биопленок уменьшались (рис. 4). В контроле средняя толщина составляла 30.13 мкм , а плотность биомассы – $27.66 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$. Наибольший подавляющий эффект ANP наблюдали при концентрации 10^{-8} М: средняя толщина понижалась до 25.6 мкм (85% от контроля), а плотность биомассы – до $18 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ (65% от контроля).

Противоположный эффект воздействия пептидов в одинаковых условиях на близкие микроорганизмы, различающиеся по своим свойствам и роли на коже человека, свидетельствует о потенциально важной функции НУП как регуляторов состава кожной микробиоты и их вовлеченности не только в гуморальные процессы в организме человека, но также, возможно, в защитные и иммунологические процессы. На полученных нами трехмерных изображениях биопленок *S. epidermidis* MFP04, окрашенных SYTO9, особенно в случае CNP, четко видно изменение структуры и толщины биопленок в присутствии исследованных НУП (рис. 5).

В контроле при 37°C биопленка *S. epidermidis* MFP04 выглядела плотным слоем с ровной поверхностью без значительных нарушений и просветов (рис. 5а). При добавлении ANP (рис. 5б) и CNP (рис. 5в) толщина и плотность биомассы биопленки увеличивались, ее визуальные параметры оставались неизменными – плотный слой биомассы без просветов. При понижении температуры до 33°C *S. epidermidis* MFP04 образовывал биопленки хуже, нежели при 37°C (рис. 5г): они были более рыхлые, появлялись просветы (темные области без флуоресценции). Добавление ANP (рис. 5д) и CNP (рис. 5е) еще сильнее ухудшало рост биопленок; в случае CNP они представляли собой по сути скопления микроколоний с большим количеством свободного пространства между ними.

Поскольку в мультивидовых (бинарных) биопленках микробные компоненты могут существенно влиять на метаболизм друг друга, мы изучили действия НУП на бинарные биопленки *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04. Сравнительный анализ прироста числа КОЕ в бинарных биопленках изучаемых стафилококков показал, что штамм *S. aureus* MFP03 обладает значительным конкурентным преимуществом перед штаммом *S. epidermidis* MFP04 как в совместной планктонной культуре, так и в составе бинарных биопленок, (рис. 6). В бинарные и моновидовые системы мы вносили в среднем 5×10^7 кл./100 мкл ($\lg = 7.7$) В моновидовых биопленках *S. aureus*

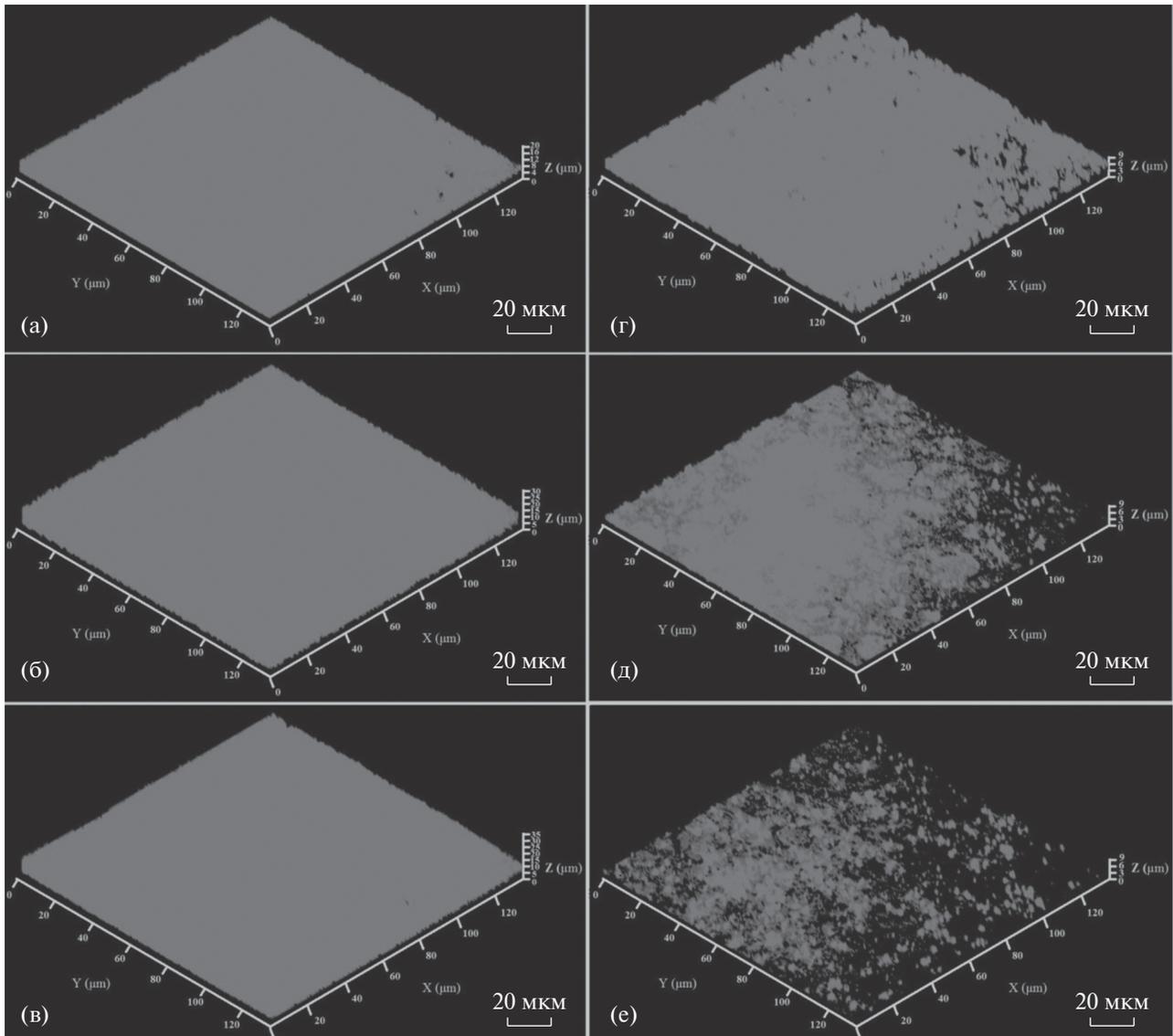


Рис. 5. Визуализация при помощи КЛСМ моновидовых биоленок *S. epidermidis* MFP04, выращенных в присутствии НУП и окрашенных SYTO9: а – контроль при 37°C; б – ANP 1×10^{-8} М при 37°C; в – CNP 1×10^{-7} М при 37°C; г – контроль при 33°C; д – ANP 1×10^{-8} М при 33°C; е – CNP 1×10^{-7} М при 33°C.

MFP03 после 24 ч культивирования число КОЕ в биоленках в составе в контроле 3.57×10^9 клеток ($\lg = 9.55$). Прирост числа КОЕ составлял $\Delta \lg = 1.8$ (рис. 6а). В моновидовых планктонных культурах в контроле число КОЕ равнялось 2.56×10^{10} ($\lg = 10.41$). Прирост числа КОЕ составлял 2.66. В бинарных биоленках количество КОЕ *S. aureus* MFP03 было 3.59×10^9 ($\lg = 9.81$), а прирост количества КОЕ *S. aureus* MFP03 составлял 1.78 (рис. 6а). В бинарных планктонных культурах число КОЕ *S. aureus* MFP03 в контроле составляло в среднем 1.9×10^{10} ($\lg = 10.28$), а прирост числа КОЕ $\Delta \lg = 2.53$ (рис. 6б). В моновидовых

биоленках *S. epidermidis* MFP04 в контроле число КОЕ после 24 ч инкубации составило 2.41×10^9 ($\lg = 9.38$), соответственно, прирост количества КОЕ составлял 1.63 (рис. 6а; 1). В моновидовых планктонных культурах число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в контроле равнялось 1.55×10^{11} ($\lg = 11.2$), а прирост числа КОЕ $\Delta \lg = 3.45$. В бинарных биоленках количество КОЕ *S. aureus* MFP03 в контроле составляло 3.46×10^9 ($\lg = 9.54$), а прирост числа КОЕ $\Delta \lg = 1.79$. Число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в бинарных биоленках равнялось в среднем 1.72×10^8 ($\lg = 8.24$), таким образом, прирост числа КОЕ понижался до 0.49. В планктон-

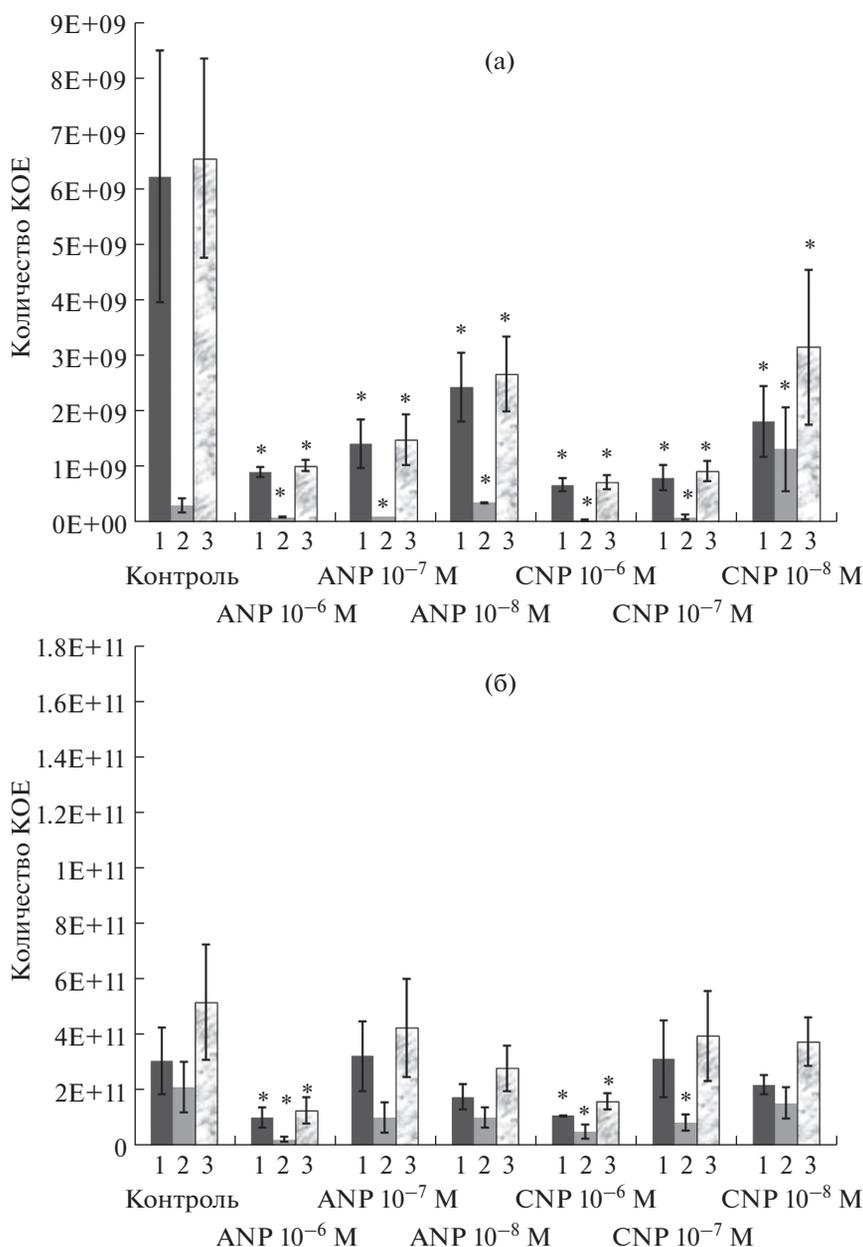


Рис. 6. Число КОЕ в бинарных биопленках (а) и планктонных культурах (б) *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04. 1 – число КОЕ *S. aureus*; 2 – число КОЕ *S. epidermidis*; 3 – суммарное число КОЕ в бинарных биопленках. * – $p < 0.05$.

ных культурах число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в контроле достигало 1.58×10^{10} ($\lg = 10.2$), а прирост числа КОЕ $\Delta \lg = 2.45$ рис. 6б; 2). Таким образом, в контрольных образцах разница в количестве КОЕ *S. epidermidis* MFP04 между моновидовыми и бинарными планктонными культурами и биопленками достигала десятикратной величины во всех случаях.

Добавление в питательную среду исследуемых НУП оказывало эффект, полностью подтверждающий результаты предыдущих опытов: прирост

числа КОЕ в моновидовых биопленках *S. epidermidis* MFP04 увеличивалось при концентрациях ANP и CNP 1×10^{-8} M ($\Delta \lg = 2.02$ и 1.81 соответственно), высокие концентрации пептидов существенного эффекта не оказывали. Моновидовые планктонные культуры *S. epidermidis* MFP04 оказались нечувствительными к присутствию НУП: прирост числа КОЕ оставалось на уровне контроля. В то же время число КОЕ в моновидовых биопленках *S. aureus* MFP03 в присутствии НУП заметно снижалось во всех случаях: $\Delta \lg = 1.23$ – 1.41 в зависимости от концентрации, тогда как

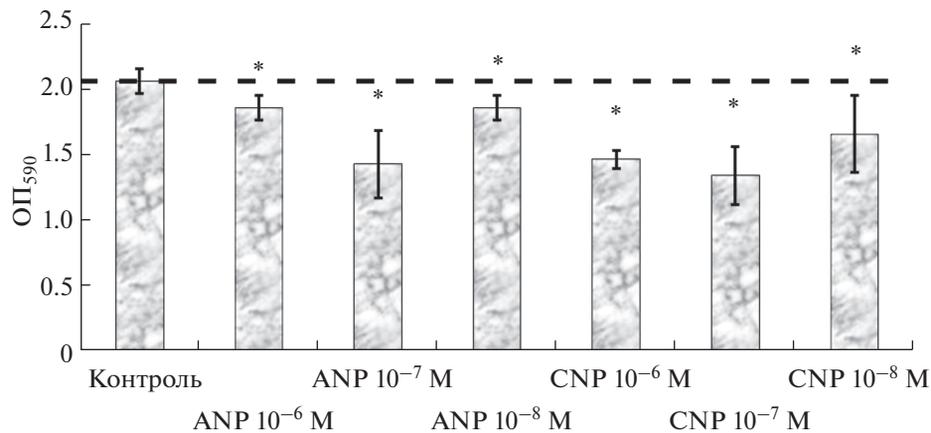


Рис. 7. Влияние НУП на метаболическую активность клеток в составе бинарных биоленок *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04. * — $p < 0.05$. На оси ординат отложена оптическая плотность экстракта формазана.

планктонные культуры оказались нечувствительными или слабочувствительными к присутствию НУП. В бинарных системах (биоленках и планктонных культурах) изменения характера воздействия НУП и его силы на *S. aureus* MFP03 не происходило практически ни в одном случае (рис. 6в–6г; 2). При всех исследованных концентрациях добавление НУП уменьшало число КОЕ обоих видов в бинарной системе. Однако те концентрации НУП, которые увеличивали прирост числа КОЕ в моновидовых биоленках *S. epidermidis* MFP04, увеличивали прирост числа КОЕ *S. epidermidis* MFP04 и в бинарных биоленках. CNP в концентрации 1×10^{-8} М увеличивал прирост числа КОЕ на $\Delta \lg = 0.46$ по сравнению с контролем (число КОЕ в контроле — 3.2×10^9 , при добавлении СТЗ — 1.34×10^{10}). ANP в той же концентрации — на $\Delta \lg = 0.08$, однако эффект этот был незначительным. Те же концентрации НУП, которые не проявляли заметного влияния на моновидовые биоленки *S. epidermidis* MFP04, в бинарной системе также оказывали лишь незначительное воздействие. При этом НУП за счет снижения числа КОЕ *S. aureus* MFP03 сдвигали баланс КОЕ в биоленках в сторону *S. epidermidis* MFP04, что особенно заметно проявилось при концентрации CNP 1×10^{-8} М. Концентрации НУП, стимулирующие рост моновидовых биоленок, не оказывали эффекта на планктонные культуры, тогда как концентрации НУП, не оказывающие эффекта на моновидовые биоленки, несколько снижали прирост числа КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в бинарной культуре.

Эффекты НУП на число КОЕ коррелируют с оптической плотностью экстрактов формазана из моновидовых бинарных биоленок (рис. 7).

За счет уменьшения числа КОЕ при добавлении НУП оптическая плотность экстракта фор-

мазана, а следовательно, и суммарная метаболическая активность заметно понижалась. В контроле ОП была равна в среднем 2.1 и сильнее всего уменьшалась при концентрации обоих НУП 1×10^{-7} М (до 1.42 и 1.33 при добавлении ANP и CNP соответственно). Уменьшение ОП экстрактов было связано с сокращением числа КОЕ, в первую очередь — *S. aureus*, в бинарных биоленках, поскольку доля *S. epidermidis* в них была относительно невелика. По результатам окрашивания МТТ метаболическая активность моновидовых биоленок также коррелировала с числом КОЕ (данные не показаны): в случае уменьшения числа КОЕ снижалась и оптическая плотность экстракта формазана.

В результате проведенных исследований мы показали, что *S. aureus* MFP03 обладает значительным конкурентным преимуществом перед *S. epidermidis* MFP04 как в совместной планктонной культуре, так и в бинарных биоленках (в которых его преимущество особенно велико). Эти результаты могут объяснять тот факт, что при различных кожных заболеваниях, когда происходит заражение кожных покровов золотистым стафилококком, он быстро становится доминирующим видом.

Мы впервые продемонстрировали, что А и С типы НУП человека способны оказывать значительное воздействие на микроорганизмы кожи и их взаимоотношения в бинарных сообществах. Особенно важно, что НУП функционируют не как хорошо известные антибактериальные вещества, вырабатываемые в организме человека, а, скорее всего, играют роль сигналов межклеточной коммуникации не только между клетками человека-хозяина, но и между организмом хозяина и его кожной микробиотой. Доказательством этому может служить тот факт, что пептиды, слабо влияя на рост планктонных культур, воздейству-

ют на формирование как моновидовых биопленок, так и на конкурентные свойства микроорганизмов в составе бинарных биопленок и планктонных культур.

Нам представляется весьма существенным тот факт, что при 37°C ANP и CNP стимулируют рост моновидовых биопленок *S. epidermidis*, тогда как в случае моновидовых биопленок *S. aureus* MFR03, оба пептида при 37°C, напротив, преимущественно подавляют их рост. Эти факты позволяют нам выдвинуть гипотезу о регуляторной и, возможно, защитной роли НУП в коже человека. В нормальных условиях (когда нет воспаления, а температура около 30–33°C, в зависимости от зоны на коже) рост культуры *S. epidermidis* (биопленки и планктонные клетки) слегка подавляется либо не изменяется под воздействием НУП. Если нарушается баланс микроорганизмов на коже, то гораздо более опасный и агрессивный *S. aureus* начинает интенсивно размножаться, что приводит к воспалению и, соответственно, к локальному (или общему) повышению температуры (до 37°C и выше). В этом случае натрийуретические пептиды начинают подавлять рост золотистого стафилококка и стимулировать рост эпидермального стафилококка. Тем самым, вероятно, снижается опасность осложнений и дополнительного ухудшения состояния, вызванного чрезмерным размножением *S. aureus*, а также восстанавливается нормальное соотношение микроорганизмов на коже. Таким образом, можно объяснить защитную роль *S. epidermidis* для кожи человека, данных о которой становится все больше (Iwase et al., 2010, Sugimoto et al., 2013), если принять, что *S. epidermidis* получает дополнительную помощь от гуморальных систем человека в противодействии агрессивным штаммам *S. aureus*. Гипотеза эта спекулятивна и нуждается в дополнительных исследованиях, в частности, в системах *in vivo*. Тем не менее, результаты нашего исследования позволяют с достаточным основанием рассматривать НУП как важный компонент системы взаимодействия микробиоты кожи и организма человека, что открывает новые перспективы как в фундаментальных аспектах дерматологии, микробиологии, и физиологии, так и в их прикладных аспектах: косметологии и фармацевтике. Эти результаты свидетельствуют о тесной эволюционной взаимосвязи между человеком и микроорганизмами-комменсалами его кожи.

Исследование жизнеспособности клеток в составе биопленок выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029). Исследование состава и бинарных биопленок, динамики роста культур и микроскопической структуры биопленок выполнены при финансовой поддержке FEDER(UE), Region Normandy и Evreux Porte de Normandie.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.
- Nikolaev Y.A., Plakunov V.K. Biofilm – “City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 125–138.
- Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. № 4. С. 484–480.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 509–513.
- Ariyaratnam S., Rood J.P. Measurement of facial skin temperature // J. Dent. 1990. V. 18. № 5. P. 250–253.
- Belkaid Y., Hand T. Role of the microbiota in immunity and inflammation // Cell. 2014. V. 157. № 1. P. 121–141.
- Blier A.-S., Veron W., Bazire A., Gerault E., Taupin L., Vieillard J., Rehel K., Dufour A., Le Derf F., Orange N., Hulén C., Feuilloley M.G., Lesouhaitier O. C-type natriuretic peptide modulates quorum sensing molecule and toxin production in *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology (SGM). 2011. V. 157. P. 1929–1944.
- Brown A.F., Leech J.M., Rogers T.R., McLoughlin R.M. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design // Front. Immunol. 2013. V. 4. № 507.
- Chiller K., Selkin B.A., Murakawa G.J. Skin microflora and bacterial infections of the skin // J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 2009. V. 6. № 3. P. 170–174a.
- Coenye T., Peeters E., Nelis H.J. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors // Res. Microbiol. 2007. V. 158. P. 386–392.
- Edwards B.S., Zimmerman R.S., Schwab T.R., Heublein D.M., Burnett Jr. J.C. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor // Circ. Res. 1988. V. 62. P. 191–195.
- El Karim I.A., Linden G.J., Orr D.F., Lundy F.T. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of microorganisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites // J. Neuroimmunol. 2008. V. 200. № 1–2. P. 11–16.
- Feuerstein R., Kolter J., Henneke P. Dynamic interactions between dermal macrophages and *Staphylococcus aureus* // J. Leukoc. Biol. 2017. V. 101. P. 99–106.
- Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J., Young A.C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard G.G., Blakesley R.W., Murray P.R., Green E.D., Turner M.L., Segre J.A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome // Science (New York, NY). 2009. V. 324. № 5931. P. 1190–1192.
- Hillion M., Mijouin L., Jaouen T., Barreau M., Meunier P., Lefeuvre L., Lati E., Chevalier S., Feuilloley M.G. Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations // MicrobiologyOpen. 2013. V. 2. P. 953–961.

- Hughes D.T., Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts // *Nature Revs. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 111–120.
- Iwase T., Uehara Y., Shinji H., Tajima A., Seo H., Takada K., Agata T., Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization // *Nature*. 2010. V. 465. № 7296. P. 346–349.
- Klinger J.R., Tsai S.W., Green S., Grinnell K.L., Machan J.T., Harrington E.O. Atrial natriuretic peptide attenuates agonist-induced pulmonary edema in mice with targeted disruption of the gene for natriuretic peptide receptor-A. // *J. Appl. Physiol.* 2013. V. 114. P. 307–315.
- Laureano A.C., Schwartz R.A., Cohen P.J. Facial bacterial infections: Folliculitis // *Clinics in Dermatology*. 2014. V. 32. P. 711–714.
- Matard B., Meylheuc T., Briandet R., Casin I., Assouly P., Cavalier-balloy B., Reygagne P. First evidence of bacterial biofilms in the anaerobe part of scalp hair follicles: a pilot comparative study in folliculitis decalvans // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013. V. 27. P. 853–860.
- N'Diaye A., Mijouin L., Hillion M., Diaz S., Konto-Ghiorghi Y., Percoco G., Chevalier S., Lefeuvre L., Harmer N.J., Lesouhaitier O., Feuilloley M.G. Effect of Substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: implication for skin homeostasis // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. № 506.
- O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay // *J. Visualized Exper: JoVE*. 2011. V. 47. № 2437.
- Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections // *Seminars in Immunopathology*. 2012. V. 34. № 2. P. 201–214.
- Piruska A., Nikcevic I., Lee S.H., Ahn C., Heineman W.R., Limbach P.A., Seliskar C.J. The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation // *Lab on a chip*. 2005. V. 5. № 12. P. 1348–1354.
- Potter L.R., Yoder A.R., Flora D.R., Antos L.K., Dickey D.M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009. V. 191. P. 341–366.
- Prescott S.L., Larcombe D.-L., Logan A.C., West C., Burks W., Caraballo L., Levin M., Etten E.V., Horwitz P., Kozyrskyj A., Campbell D.E. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming // *World Allergy Organ. J.* 2017. V. 10. P. 29. doi 10.1186/s40413-017-0160-5
- Rosay T., Bazire A., Diaz S., Clamens T., Blier A.S., Mijouin L., Hoffmann B., Sergent J.A., Bouffartigues E., Boireau W., Vieillard J., Hulen C., Dufour A., Harmer N.J., Feuilloley M.G., Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation // *mBio*. 2015. V. 6. № 4. e01033-15.
- Sabaté Brescó M., Harris L.G., Thompson K., Stanic B., Morgenstern M., O'Mahony L., Richards R.G., Moriarty T.F. Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. № 1401.
- Sandvik E.L., McLeod B.R., Parker A.E., Stewart P.S. Direct electric current treatment under physiologic saline conditions kills *Staphylococcus epidermidis* biofilms via electrolytic generation of hypochlorous acid. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. e55118.
- Severini C., Improta G., Falconieri-Ersamer G., Salvadori S., Ersamer V. The tachykinin peptide family // *Pharmacol. Rev.* 2002. V. 54. P. 285–322.
- Stingo A.J., Clavell A.L., Heublein D.M., Wei C.M., Pittelkow M.R., Burnett Jr. J.C. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma // *Am. J. Physiol.* 1992. V. 263. P. 1318–1321.
- Sugimoto S., Iwamoto T., Takada K., Okuda K., Tajima A., Iwase T., Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 1645–1655.
- Vandecandelaere I., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Coenye T. Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 3. e0172700.
- Veron W., Lesouhaitier O., Pennanec X., Rehel K., Leroux P., Orange N., Feuilloley M.G. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis // *FEBS J.* 2007. V. 274. P. 5852–5864.
- Veron W., Orange N., Feuilloley M.G., Lesouhaitier O. Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure // *BMC Microbiology*. 2008. V. 8. № 114. doi 10.1186/1471-2180-8-114

Regulation of Formation of Monospecies and Binary Biofilms by Human Skin Microbiota Components, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, by Human Natriuretic Peptides

A. V. Gannesen^{1, 2, 3, *}, O. Lesouhaitier³, A. I. Netrusov¹, V. K. Plakunov², and M. G. J. Feuilloley³

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Laboratory of microbiology signals and microenvironment LMSM EA4312 (Laboratoire de microbiologie signaux et microenvironnement LMSM EA4312), Rouen University, Evreux, France

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

Received January 16, 2018

Abstract—Human natriuretic peptides (NUPs) types A and C were shown have different effects on the growth of monospecies and binary biofilms of human skin commensal microorganisms *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. The effect of natriuretic peptides depended on cultivation conditions: at 37°C growth of monospecies biofilms formed by *S. epidermidis* and *S. aureus* was stimulated and inhibited, respectively, resulting in changed values of the biofilm average thickness and biomass in presence of NUPs. At 33°C effects of NUPs reversed: growth of *S. epidermidis* monospecies biofilms was inhibited. In binary biofilms at 37°C, NUPs were able to increase the competitiveness of *S. epidermidis* against *S. aureus*. NUPs affected predominantly biofilms and, to a lesser degree, planktonic cultures. This phenomenon makes it possible to consider NUPs as the molecules able to regulate the interactions between the human organism and skin microbiota.

Keywords: natriuretic peptides, biofilms, binary biofilms, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, regulation of biofilm formation

ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ БИОПЛЕНОК *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245

© 2018 г. А. В. Шелудько^а, * Ю. А. Филипьева^а, Е. М. Телешева^а, А. М. Буров^а,
С. С. Евстигнеева^а, Г. Л. Бурьгин^а, Л. П. Петрова^а

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

*e-mail: shel71@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2018 г.

В настоящей работе исследованы структура и функции биополимеров матрикса биопленок *Azospirillum brasilense*, образующихся на границе раздела фаз жидкая среда–твёрдая поверхность. Показано, что полисахариды, связывающие калькофлуор (ПССК), и комплексы, содержащие липополисахариды (ЛПС) и белковые структуры, фиксируют зрелые биопленки на твёрдой поверхности и выполняют каркасную функцию. В составе матрикса зрелых биопленок присутствует углеводный гаптен, обладающий специфическим сродством к агглютинину зародышей пшеницы (АЗП), что играет важную роль для ассоциативного взаимодействия и колонизации корневой системы растений. Углеводсодержащие компоненты, доминирующие над белковыми составляющими матрикса, опосредуют прикрепление биопленок преимущественно к поверхностям с гидрофильными свойствами, что наиболее очевидно в случае мутантов штамма *A. brasilense* Sp245, имеющих дефекты в образовании жгутиков. Впервые получены косвенные данные о присутствии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы.

Ключевые слова: биопленки, матрикс, полисахариды, ЛПС, калькофлуор, конго красный, агглютинин зародышей пшеницы, амилоиды

DOI: 10.1134/S0026365618050166

Альфапротеобактерии *Azospirillum brasilense* вступают в ассоциативное взаимодействие с широким кругом растений, колонизируя их корневую систему (Fibach-Paldi et al., 2012). Определённое значение для успешного функционирования растительно-микробной ассоциации может иметь способность азоспирилл формировать биопленки. Образование биопленочных сообществ на поверхности подземных органов растения-хозяина способствует не только адаптации микроорганизмов к существованию в динамичной почвенной среде, но и приносит пользу растению, защищая его от фитопатогенов и поставляя ему полезные физиологически активные соединения (Fibach-Paldi et al., 2012; Vogino et al., 2013; Kamnev et al., 2005). Бактериальные биопленки – это пространственно и метаболически структурированные сообщества заключённых в матрикс микроорганизмов (Flemming, Wingender, 2010). Функции матрикса в биопленках разнообразны: помимо структурного каркаса, он является резервуаром ростовых факторов, ферментов и питательных веществ, играет защитную роль. Матрикс представляет собой сильно гидратированную структуру, медленно высыхает, чем предохраняет микроорганизмы от изменений водного потенциала. Структурной ос-

новой внеклеточного матрикса биопленок является смесь экзополисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других биополимеров. Присутствующие в биопленках белковые компоненты амилоидной природы, связывающие краситель конго красный, устойчивы к изменениям таких факторов окружающей среды, как гидрофобность, концентрация соли, рН, температура, давление, влияние денатурирующих агентов и протеиназ (Fowler et al., 2007; Плакунов и соавт., 2017). Жгутики и пили бактерий также интегрированы в матрикс и поддерживают его архитектуру. Разнообразие структурных компонентов матрикса биопленок сопоставимо с количеством видов бактерий, образующих биопленки (Flemming, Wingender, 2010; Vogino et al., 2013). Характеристика этих элементов необходима для понимания механизмов формирования и дисперсии биопленок, подбора способов управления данными процессами в экологических, медицинских и биотехнологических целях (Плакунов и соавт., 2017; Tugarova et al., 2017).

Для многих микроорганизмов основными компонентами формирующихся и функционирующих биопленок являются экзополисахариды. Изменения в синтезе липополисахаридов и поверхностных полисахаридов, связывающих каль-

кофлуор, дефекты в функционировании полярного жгутика оказывали заметное влияние на эффективность формирования биопленок соответствующих мутантов штамма *A. brasilense* Sp245 (Шелудько и соавт., 2008). Биопленки лишённого жгутиков мутанта с инактивированной хромосомной копией флагеллярного гена *flhB* (*flhB1*) содержали меньшее количество биомассы и были менее стабильны по сравнению с биопленками дикого штамма Sp245. Сохранение Fla на клетках штамма Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, предположительно способствовало поддержанию ее целостности в условиях гидродинамического сдвига (Шелудько и соавт., 2015). Другие компоненты матрикса, в том числе и гликополимеры, обеспечивающие прикрепление биопленок к поверхности и стабилизирующие структурную целостность зрелых биопленок *A. brasilense*, в этих работах не были охарактеризованы. Биопленки мутантов, лишённых жгутиков, являются удобной моделью для изучения роли прочих структур клеточной поверхности и экзополимеров в организации биопленочного матрикса. В этом аспекте интересны мутанты Sp245 по предполагаемым генам 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы (*mmsB1*) и 3-оксоацил-[ацил-переносающий белок]-редуктазы (*fabG1*). Эти мутанты имеют дефекты в образовании жгутиков и, соответственно, в роении и активном плавании клеток (Ковтунов и соавт., 2013). Инактивация генов *fabG1* или *mmsB1* также повлияла на некоторые характеристики клеточной поверхности азоспирилл, включая изменения в относительной гидрофобности и динамике агрегации планктонных клеток (Шумилова и соавт., 2016).

Цель данной работы – исследовать углеводсодержащие компоненты биомассы биопленок *A. brasilense* Sp245 и особенности взаимодействия с ней красителя конго красного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и питательные среды. В работе использовали: штамм *A. brasilense* Sp245, выделенный в Бразилии из корней пшеницы (Baldani et al., 1983), и его (Km^R) мутанты leaky Fla⁻Mot⁻Swa⁻SK039 (*mmsB1::*Omegon-Km), Fla⁻Laf⁻Sp245.1063 (*flhB1::*Omegon-Km) и leaky Fla⁻/Mot⁻Laf⁻Swa⁻Sp245.1610 (*fabG1::*Omegon-Km) (Ковтунов и соавт., 2013а, 2013б). Мутанты SK039 и Sp245.1610 содержат одиночную вставку искусственного транспозона Omegon-Km в центральной части предполагаемых генов липидного метаболизма, локализованных в хромосоме (*mmsB1*) и мегаплазмиде AZOBR_p1 (*fabG1*) соответственно. У Sp245.1063 инсерция Omegon-Km находится в хромосомной копии гена *flhB* (*flhB1*), кодирующего компонент аппарата экспорта флагеллярных белков.

Для культивирования азоспирилл использовали малатно-солевую среду (MSM) (Döbereiner, Day, 1976) или среду LB (Sambrook et al., 1989). При необходимости в среды вносили канамицин (Km) (до концентрации 50 мкг/мл) и прижизненные красители калькофлуор (Fluorescent Brightener 28; “Sigma–Aldrich”, США) или конго красный (до 0.5 или 37.5 мкг/мл соответственно).

Анализ процесса формирования и микроструктуры биопленок азоспирилл. Культуры азоспирилл, инкубированные в течение 18 ч в жидкой среде LB или MSM, разводили свежей средой до значений ОП₅₉₀ = 0.05–0.10, вносили в: (1) стеклянные пробирки (по 2 мл), (2) ячейки полистирольных планшетов с 96 плоскодонными лунками (по 200 мкл) или (3) полистирольные чашки Петри (по 3 мл), на дне которых находились стеклянные покровные стекла для микроскопии, и инкубировали в течение 6 сут при 30°C в стационарных условиях. У азоспирилл к 6 сут инкубации стабилизируется относительное количество биомассы биопленок и завершается процесс их формирования на поверхности стекла (зрелые биопленки), находящихся в жидкой среде (Шелудько и соавт., 2015, Шумилова и соавт., 2016). Покровные стекла с образовавшимися на них биопленками использовали для микроскопии.

Для оценки относительного количества биомассы в биопленках бактерии окрашивали кристаллическим фиолетовым (O’Toole, Kolter, 1998). Перед анализом биопленок отбирали аспирацией жидкую среду с планктонной культурой. К осторожно промытым дистиллированной водой биопленкам добавляли соответствующий объем (2 мл или 200 мкл) 1% водного раствора кристаллического фиолетового, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и, после удаления раствора, опять промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в 2 мл или 200 мкл этанола и измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 590 нм на фотоколориметре КФК-2 (“Загорский оптико-механический завод”, Россия) или фотометре микропланшетного формата Multiskan Ascent (“ThermoLabsystems”, Финляндия). Измерения проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” (ЦКП “Симбиоз”) Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН, г. Саратов, Россия).

В ряде экспериментов промытые водой биопленки осторожно окрашивали 30 мин водным раствором калькофлуора или конго красного (50 или 37.5 мкг/мл соответственно) и опять промывали дистиллированной водой.

Фазово-контрастную, флуоресцентную и просвечивающую электронную микроскопию биопленок и отдельных клеток выполняли на приборах, находящихся в ЦКП “Симбиоз” ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия): Leica DM6000 B (“Leica-Microsystems”, Германия) и Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия). Подробную информацию о процедурах подготовки препаратов для микроскопии и их анализа можно найти в работе Шелудько и соавт. (2015).

Мечение азоспирилл агглютинином зародышей пшеницы, конъюгированным с коллоидным золотом. Фрагменты биопленок после промывывания 50 мМ фосфатным буфером (ФБ; pH 7.0) с покровного стекла переносили на никелевые сетки с формваровой подложкой. Клетки из планктонной культуры наносили на аналогичные подложки флотацией. Сетки с нанесенными препаратами высушивали и использовали для мечения агглютинином зародышей пшеницы, конъюгированным с коллоидным золотом со средним диаметром частиц 15 нм (АЗП-К315), предоставленным д.б.н. В.А. Богатыревым (лаборатория нанобиотехнологии ИБФРМ РАН). АЗП-К315 получали согласно подходу, описанному в работе (Дыкман, Богатырев, 2007). Сетку с биоматериалом 20 мин выдерживали на капле ФБ (pH 7.0) с 0.02% Twin-20, переносили на 30 мин в раствор АЗП-К315. Для удаления избытка золота сетки последовательно промывали ФБ (pH 7.0) с 0.02% Twin-20, бидистиллированной водой и высушивали. Препараты просматривали в электронном микроскопе. В контрольных образцах активные центры агглютинина предварительно в течение 1 ч блокировали хитотриозой (олигомер *N*-ацетил- β -D-глюкозамина (*N,N,N'*-триацетилхитотриоза)), добавленной до 0.05 мг/мл к раствору АЗП-К315. Замена хитотриозы на глюкозу не влияла на взаимодействие АЗП-К315 с азоспириллами.

Обработка биопленок периодатом натрия и протеазами. В работе использовали 40 мМ раствор NaIO_4 в дистиллированной воде. Проназу растворяли в 100 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5) до концентрации 1000 мкг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C, затем разводили в 50 мМ ФБ (pH 7.0) в соотношении 1 : 9. Растворы фермента или NaIO_4 добавляли к биопленкам, предварительно удалив планктонную культуру (по 2 мл в стеклянные пробирки и 200 мкл в лунки полистирольных планшетов), с ферментами инкубировали 2 ч при 37°C. В контрольных вариантах использовали ФБ (pH 7.0). С NaIO_4 инкубировали 23 ч при 4°C. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, содержащую по 40 мМ NaIO_4 и глюкозы. Протеазами и NaIO_4 обрабатывали также биопленки, сформированные на покровных стеклах, или препараты ЛПС, адсорбировавшиеся на стенках лунок планшетов для ИФА.

После инкубации биопленки однократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре, затем дважды промывали дистиллированной водой. Краситель, связавшийся с биомассой биопленок, растворяли в этаноле и измеряли при $\lambda = 590$ нм ($l = 0.5$ см) оптическую плотность раствора. Результаты выражали в процентах относительно соответствующих контрольных проб.

Абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия. Для спектроскопии использовали биомассу зрелых биопленок, сформированных на поверхности стекла под средами с калькофлуором или конго красным. После удаления планктонных бактерий биопленки промывали 50 мМ ФБ (pH 7.0), смывали их пипетированием, трижды промывали и доводили до $\text{ОП}_{590} = 0.2-0.5$ ($l = 1.0$ см) этим буфером. Растворы калькофлуора (50 мкг/мл) и конго красного (12.5 мкг/мл) в ФБ (pH 7.0) использовали для получения контрольных спектров. При необходимости суспензии биомассы и растворы красителя разбавляли буфером. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре SPECORD 40 (“Analytik Jena”, Германия), в кварцевых кюветках ($l = 1.0$ см). Флуоресцентная спектроскопия была выполнена с использованием спектрофлуориметра Agilent Cary Eclipse (США), в флуориметрической кювете ($l = 1.0$ см). Полоса пропускания, используемая для эмиссии, составляла 2 нм. Флуоресценцию эмиссионных спектров возбуждали $\lambda_{\text{exc}} = 365$ нм, соответствующей типичному режиму возбуждения калькофлуора, используемому в флуоресцентной микроскопии окрашенных этим красителем микроорганизмов.

Оценка содержания углеводовсодержащих и белковых компонентов в матриксе биопленок. Выделение компонентов матрикса проводили согласно рекомендациям, описанным в работе (Wang et al., 2017). Биомассу зрелых биопленок, сформированных на поверхности стекла, после удаления планктонных бактерий промывали 50 мМ ФБ (pH 7.0) и смывали пипетированием этим буфером. Анализировали легко смываемые компоненты, перешедшие в супернатант при центрифугировании биомассы после ее промывывания ФБ (pH 7.0) (ФБ-“экстракты”). Процедуру повторяли трижды, собирая супернатант. Из отмытой биомассы экстрагировали 0.5 М ЭДТА (ЭДТА-“экстракты”) более прочно связанные составляющие матрикса. Содержание в соответствующих экстрактах углеводовсодержащих и белковых компонентов определяли фенол-серным методом и реакцией по Бредфорду соответственно (Wang et al., 2017).

Выделение ЛПС. Препараты ЛПС получали в результате экстракции горячим водным фенолом отмытых от капсульного материала и высушен-

ных ацетоном бактериальных клеток из 18-ч культур, выращенных в жидкой среде. Содержание в полученных препаратах углеводов, белков и нуклеиновых кислот оценивали ранее (Шумилова и соавт., 2016).

Иммунохимические реакции. Для твердофазного непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) использовали биомассу 6-сут биопленок, сформированных в 96-луночных полистирольных планшетах (планктонную культуру удаляли из лунок), препараты ЛПС и экстракты матрикса биопленок. Водные растворы ЛПС по 5 и 50 мкг/мл или матрикс вносили в лунки планшета, инкубировали при 4°C и удаляли спустя 12 ч. При необходимости биопленки или ЛПС, адсорбированные на стенках лунок планшетов, обрабатывали периодатом натрия. Для блокирования свободных сайтов на полистироле в лунки планшетов на 40 мин вносили по 100 мкл 0.05% водного раствора полиэтиленгликоля 2000. Дальнейшие манипуляции выполняли, как описано ранее (Шелудько и соавт., 2008). Для выявления антигенов использовали кроличьи антитела (Ат) на ЛПС штамма *A. brasilense* Sp245 (Матора и соавт., 1998) в концентрации 50 мкг/мл. Вторичными антителами были козы антикроличьи Ат, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Sigma", США) в концентрации 1 мкг/мл. Для оценки активности пероксидазы использовали раствор 0.03% *o*-фенилендиамина и 0.02% перекиси водорода в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5). Измерение оптической плотности (ОП₄₉₀) исследуемых проб проводили на фотометре Multiskan Ascent ("ThermoLabsystems", Финляндия) в ЦКП "Симбиоз" ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия).

Двойную иммунодиффузию проводили по стандартной методике в 1%-ных агарозных гелях. Гели окрашивали красителем Кумасси R-250.

Статистическая обработка результатов. Во всех случаях количественных измерений проводили не менее трех независимых экспериментов как минимум в трех повторностях. Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее шести раз. Каждый раз окрашивали биопленки, сформированные в пяти стеклянных пробирках или десяти ячейках полистирольных планшетов. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние периодата натрия на биопленки штамма *A. brasilense* Sp245 и его *flhB1* (Sp245.1063), *fabG1* (Sp245.1610) и *mmsB1* (SK039) мутантов. После инкубации с периодатом натрия (окисляет полисахариды) биомасса зрелых биопленок Sp245, сформированных на стекле под LB, убывает при-

мерно на 40% (рис. 1в). В случае лишенных жгутиков мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 эта величина составляет 60–75%. На стекле под MSM или на полистироле под LB/MSM устойчивость биопленок всех штаммов к периодатному окислению возрастает, а величина биомассы биопленок снижается примерно на 20% (рис. 1в, 1г).

Стоит отметить, что после инкубации с периодатом нарушается единство клеток, образующих пленку, как на стекле, так и на полистироле. Часть бактерий из биопленок становятся либо свободными, либо находятся в составе агрегатов. При окрашивании кристаллическим фиолетовым эти и более крупные фрагменты биопленок могут отслаиваться от поверхности стекла даже при осторожном промывании водой. Биомасса в биопленках лишенных жгутиков штаммов Sp245.1063 и SK039 существенно уступает этому показателю штамма Sp245 (рис. 1а). Биопленки мутанта с аналогичным фенотипом Sp245.1610 и родительского штамма на гидрофильной поверхности стекла существенно не отличаются. Тем не менее, в случае всех мутантов после инкубации с окислителем гликополимеров их пленки теряют на 20–35% больше биомассы, чем у штамма Sp245. Таким образом, углеводсодержащие составляющие биомассы являются частью многокомпонентной системы механизмов, опосредующих как сродство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами, так и их структурную целостность.

Оценка соотношения углеводсодержащих и белковых компонентов в матриксе, полученном из смывы с поверхности стекла биомассы биопленок, показала доминирование углеводов составляющих над белковыми в случае всех исследованных штаммов (рис. 2). Анализировали легко смываемые компоненты, перешедшие в супернатант при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ (рН 7.0) (ФБ-"экстракты"), и более прочно связанные, которые экстрагировали ЭДТА (ЭДТА-"экстракты"). Отношение углеводов/белок меняется в зависимости от состава среды культивирования. В экстрактах биопленок из LB этот показатель (среднее значение для всех исследованных штаммов и способов экстракции) составляет 4.3 ± 0.6 , а в случае пленок из MSM снижается до 2.8 ± 0.7 . Вполне вероятно, снижение показателя соотношения углеводов/белок в матриксе сказывается на повышении устойчивости к периодатному окислению бактериальных пленок, сформированных под MSM. Белковые составляющие матрикса, так же как и углеводсодержащие компоненты, выполняют, в том числе, каркасную функцию. Так, после инкубации с проназой биомасса биопленок Sp245, Sp245.1063 или SK039, сформированных под LB на стекле, убывала примерно на 30%, а у Sp245.1610 – на 46% (рис. 1д). В случае пленок на полистироле умень-

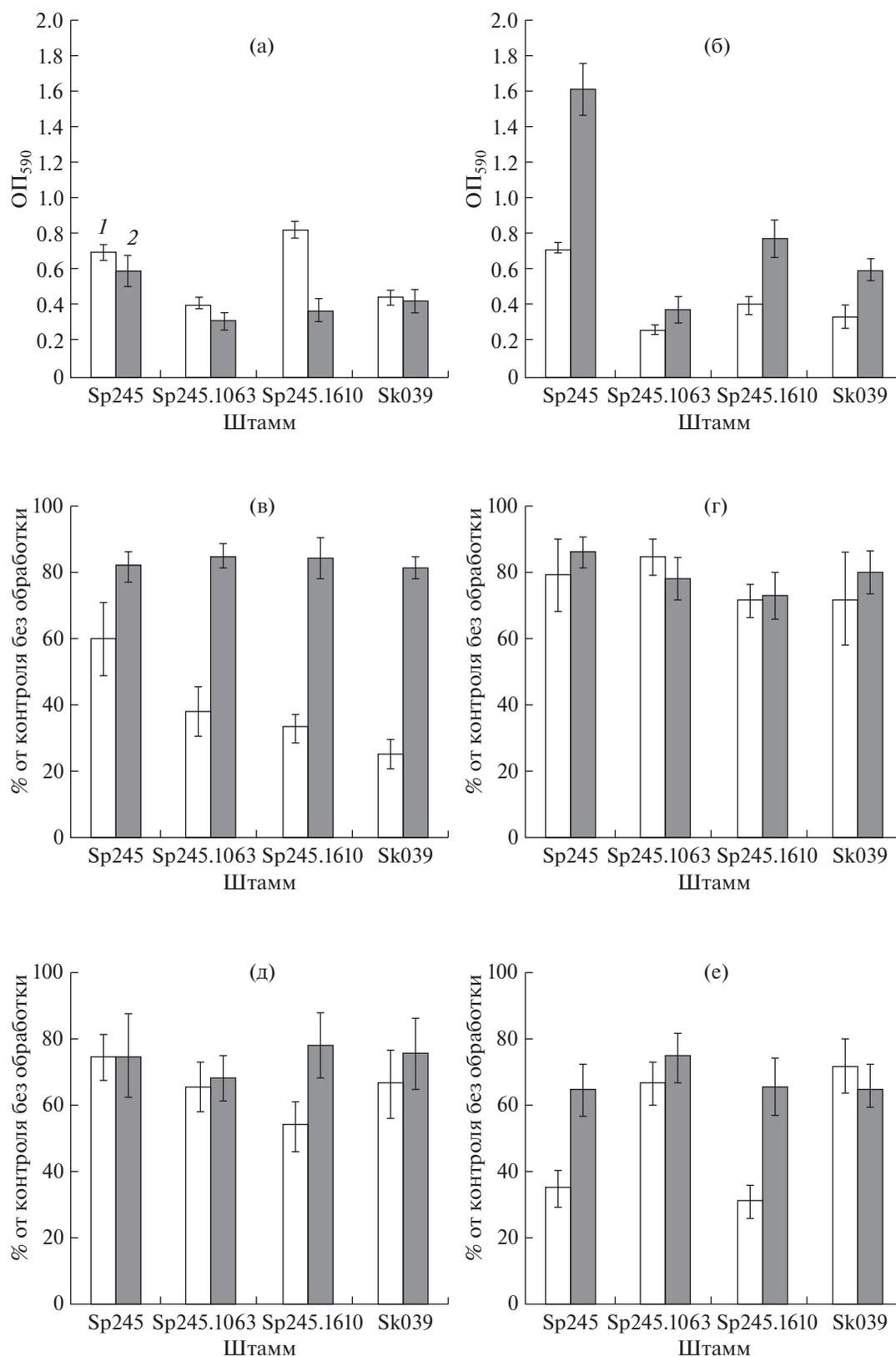


Рис. 1. Влияние периодата натрия и проназы на биомассу зрелых биопленок *A. brasilense*, сформированных на стекле (а, в, д) и полистироле (б, г, е) под жидкой средой LB (1) или MSM (2). Обозначения: (а, б) – ОП₅₉₀ (оптическая плотность) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок до обработки периодатом натрия и проназой; (в, г) – процентное отношение оптической плотности красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в растворе периодата натрия или проназы (д, е), к аналогичному показателю без обработки.

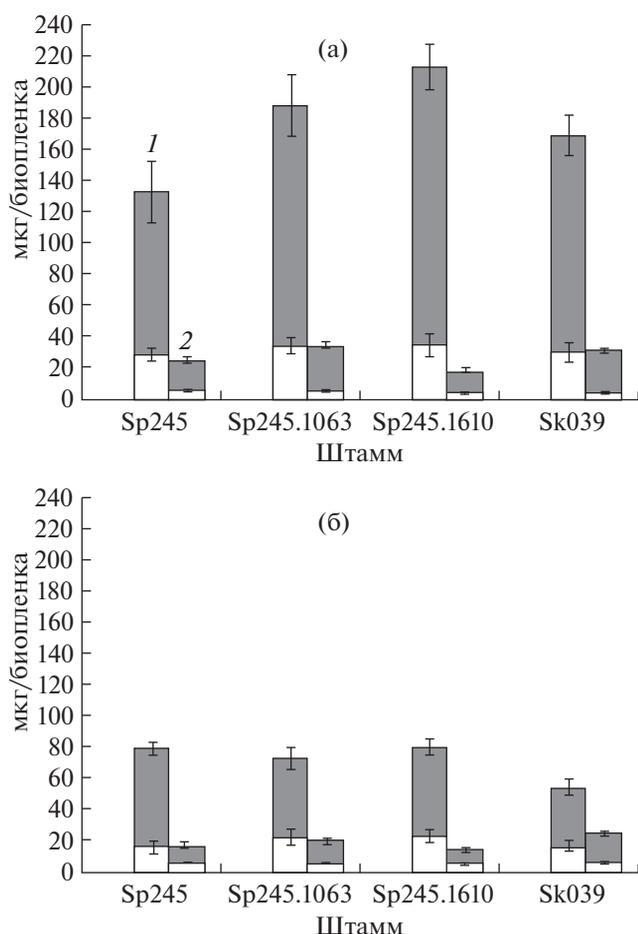


Рис. 2. Содержание углеводов и белка в матрице зрелых биопленок *A. brasilense*, сформированных на стекле под LB (а) и MSM (б). Обозначения: 1 – ФБ-“экстракты” (легко смываемые компоненты, переходящие в супернатант при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ при pH 7.0); 2 – ЭДТА-“экстракты” (более прочно связанные составляющие); серые столбцы – углеводы; белые столбцы – белок.

шение составило 65, 33, 28 и 69% соответственно (рис. 1е). Проназа одинаково действовала на пленки, сформированные под MSM на стекле или полистироле (рис. 1д, 1е). У всех исследованных штаммов биомасса биопленок уменьшалась примерно на 20–30% под действием протеазы.

Исследование значения ЛПС для стабилизации биомассы биопленок. Легко смываемые компоненты (ФБ-“экстракты”) и более прочно связанные составляющие (ЭДТА-“экстракты”) матрикса биопленок Sp245 и его мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 или SK039 в иммунохимических реакциях (двойная иммунодиффузия и ИФА) взаимодействовали с поликлональными антителами, специфичными к мембранным ЛПС родительского штамма (Матора, Щеголев, 2002). Повторяющееся звено *O*-полисахарида ЛПС (ОПС) штамма Sp245 является пента-D-рамнаном (Fedopenko et al., 2002). Итогом окисления ЛПС периодатом натрия будет модификация *O*-полисахарида штамма Sp245 (периодат натрия окисляет полисахариды с образованием диальдегидполисахаридов). В модельном эксперименте после обработки периодатом препаратов ЛПС (5 мкг/мл) штаммов Sp245, Sp245.1610 и SK039 снижается уровень взаимодействия Ат с ЛПС (табл. 1, столбец 3). Очевидно, окисление периодатом оказывает влияние на антигенные характеристики ЛПС. При увеличении количества окисляемого субстрата на порядок (50 мкг/мл) антигенные свойства ЛПС изменяются меньше (табл. 1, столбец 3). В биопленках возможная модификация периодатом натрия гликополимеров, в том числе ОПС, снижает уровень взаимодействия Ат с ними у Sp245 и Sp245.1610 на 30%, а у Sp245.1063 и SK039 на 20% (табл. 1, столбец 4). Устойчивость части липополисахаридного антигена к окислению, вероятно, обусловлена высоким содержанием гликополимеров в матрице (рис. 2), его высоким содержанием в биомассе, особенно в слу-

Таблица 1. Выявление иммуноферментным анализом (ИФА) липополисахаридных (ЛПС) антигенов (3) с различным содержанием углеводов (1) в биопленках *A. brasilense* (2 и 4), сформированных на полистироле за 6 сут под жидкой средой LB, после периодатного окисления (3 и 4)

Штамм	(1) содержание углеводов в препарате ЛПС, весовые %	(2) результаты ИФА (ОП ₄₉₀) анти-ЛПС антител с биопленками	Отношение результатов взаимодействия в ИФА анти-ЛПС антител с антигеном после инкубации с периодатом натрия к аналогичному показателю в контроле (2), %		
			(3)		(4) биопленки
			препарат ЛПС, мкг/мл*		
			50	5	
Sp245	65.8 ± 2.1	0.38 ± 0.03	84.3 ± 3.7	49.8 ± 8.0	64.1 ± 7.4
Sp245.1063	Н.о.	0.24 ± 0.02	Н.о.	Н.о.	76.8 ± 5.3
Sp245.1610	75.9 ± 5.5	0.24 ± 0.02	86.4 ± 7.2	77.4 ± 5.7	67.5 ± 7.7
SK039	44.1 ± 2.5	0.27 ± 0.04	84.1 ± 7.0	34.3 ± 6.2	87.1 ± 7.7

* Концентрация растворенного препарата, внесенного в лунки планшета для ИФА.

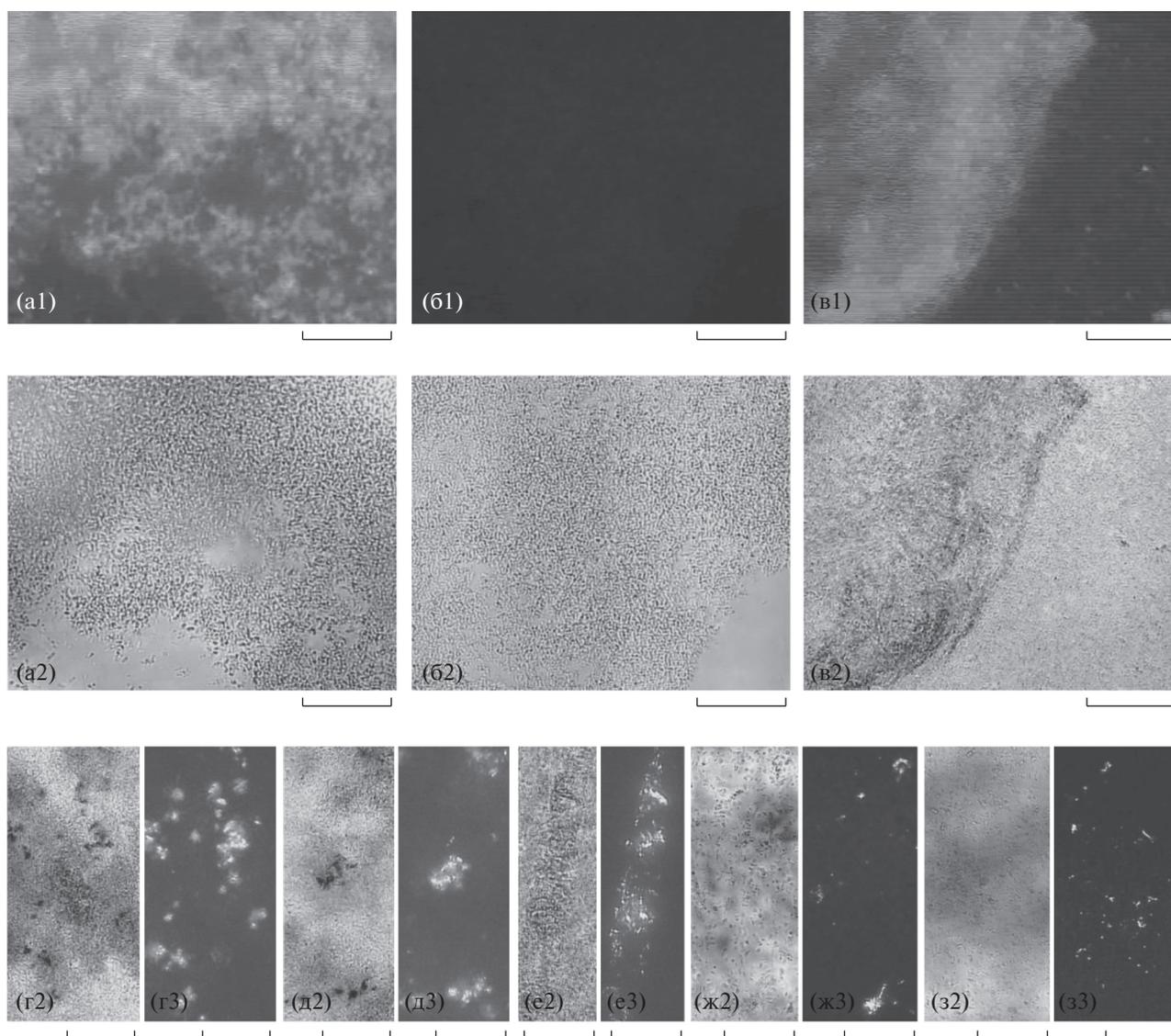


Рис. 3. Световая микроскопия зрелых биопленок *A. brasilense* Sp245 (а–д), Sp245.1063 (е), Sp245.1610 (ж) и SK039 (з), выращенных на стекле под жидкой LB (а–в, д–з) или MSM (г). Биопленки после инкубации с периодатом натрия (б) или проназой (в). Окрашивание калькофлуором (а–в) или конго красным (г–з). Видимый свет (2), УФ (1) или поляризованная световая микроскопия при скрещенных поляризаторах (3). Масштаб 50 мкм.

чае “тонких”, по сравнению с показателями родительского штамма, пленках мутантов (Шумилова и соавт., 2016). Так, отношение показателя, характеризующего содержание ЛПС антигенов в биопленках, сформированных под LB (табл. 1, столбец 2), к показателю, характеризующему их биомассу (рис. 1б), в случае штаммов Sp245, Sp245.1063, Sp245.1610 или SK039 составило, соответственно, 0,5, 0,9, 0,8 или 1,0. Толщина пленок, вероятно, также может влиять на доступность ЛПС для окисления периодатом (таблица, рис. 1). Очевидно, в “толстых” биопленках (Sp245) или пленках с высоким содержанием ЛПС и/или других гликополимеров после периодатного окисления остается значительная доля липополисахари-

да, сохраняющего антигенные свойства. Тем не менее, даже в этом случае последствиями инкубации с окислителем является снижение биомассы биопленок, наиболее заметное на гидрофильной поверхности (рис. 1в).

Исследование значения структур, связывающих калькофлуор и/или конго красный, для стабилизации биомассы биопленок. Биомасса нативных биопленок всех исследованных штаммов связывает флуоресцирующий краситель калькофлуор (см., например, результаты микроскопии биопленок Sp245 на рис. 3) и взаимодействует с конго красным. Окрашивание этими анионными красителями позволяет обнаружить β -глюканы, присутствующие в составе сложного комплекса бак-

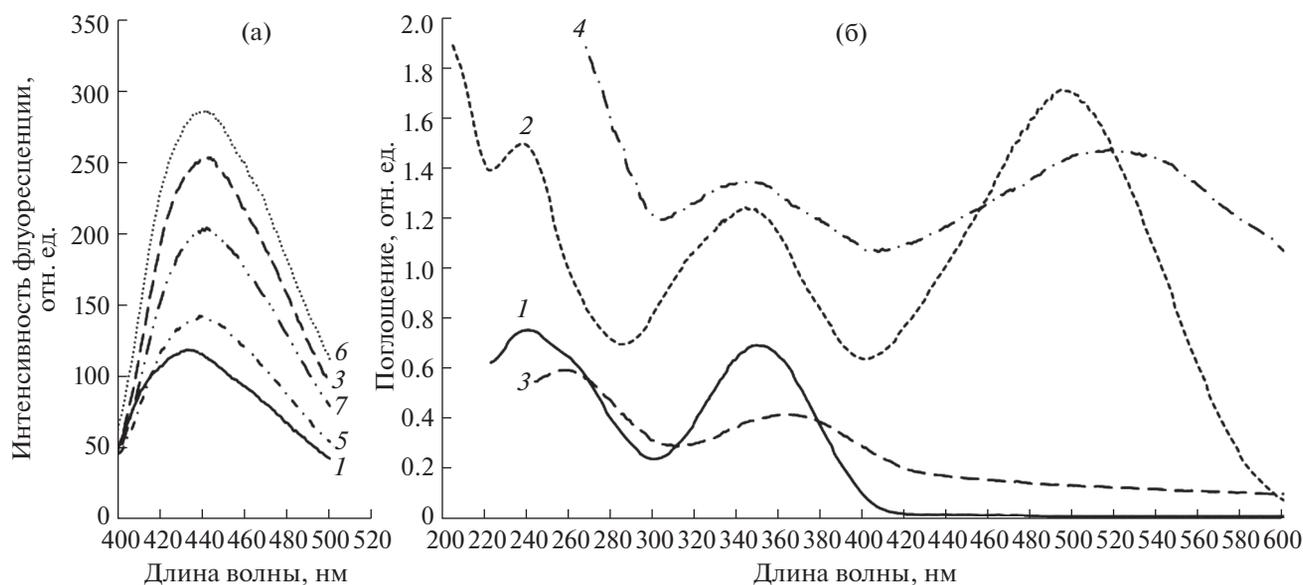


Рис. 4. Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) в ФБ (рН 7.0) растворов красителей калькофлуора (1, 3, 5–7) и конго красного (2, 4) или их комплексов в суспензиях биомассы биопленок *A. brasilense* Sp245 (3, 4), Sp245.1063 (5), Sp245.1610 (6), SK039 (7).

териальных полисахаридов (Skvortsov, Ignatov, 1998; Wood, 1980). Максимум флуоресценции люминофора, накопленного биомассой, смывтой с поверхности стекла ФБ (рН 7.0), всех исследованных штаммов (рис. 4а) смещен в сторону более длинных волн по сравнению с аналогичным показателем его раствора в сходном буфере (для всех штаммов сдвиг был примерно одинаковым и составил 8.0 ± 1.0 нм). Похожее смещение максимума интенсивности флуоресценции типично для растворов комплексов калькофлуора с полимерами полисахаридной природы (Wood, 1980; Plasek, Hoskova, 2010). Флуоресценция окрашенных калькофлуором биопленок после инкубации с окислителем гликополимеров периодатом натрия (нарушается единство клеток, образующих пленку, и снижается количество ее биомассы; рис. 1в, 1г) менее интенсивна в сравнении с необработанными пленками (см., например, результаты микроскопии биопленок Sp245 на рис. 3б). Очевидно, модифицированные после окисления периодатом компоненты биомассы связывают меньше красителя. Обработка проназой не влияет на связывание красителя с биопленками (флуоресценция окрашенных пленок сохраняется; рис. 3в).

Спектроскопия смывтой с поверхности стекла биомассы биопленок из среды с калькофлуором или конго красным показала сходные изменения спектра поглощения каждой из красок, накопленной в биопленках Sp245, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 (на рис. 4б в качестве примера представлены спектры красителей, связавшихся с биомассой родительского штамма). Красители, связанные с биомассой штамма Sp245, поглощали с максимумом

при 362.0 ± 3.0 или 515.0 ± 2.0 нм соответственно, тогда как эти величины для их растворов в фосфатном буфере составляли 349.0 или 495.0 нм (характерные максимумы поглощения красителей при рН 7.0; Wood, 1980; Plasek, Hoskova, 2010). Смещение спектров флуоресценции калькофлуора и максимумов поглощения этого красителя (≥ 10 нм) или конго красного (≥ 20 нм) свидетельствует о возможном образовании красителями комплекса с β -глюканами (Wood, 1980). Красители сохраняются в составе биомассы биопленок после промывания и удаления легкосмываемых компонентов матрикса (рис. 4б). В смывах также присутствуют калькофлуор и конго.

Необходимо отметить, что конго красный взаимодействует, помимо глюканов, с белковыми структурами – амилоидами (Fowler et al., 2007). Амилоидные структуры, присутствующие в биопленках грамотрицательных бактерий, опосредуют прикрепление микроорганизмов к множеству субстратов, включая поверхность корней растений (Fowler et al., 2007; Плакунов и соавт., 2017; Jeter, Matthyse, 2005). Определенный вклад в изменение спектра поглощения конго красного, накопленного азоспириллами в биопленках, помимо полисахаридов, могут вносить подобные структуры. Биопленки азоспирилл, окрашенные красителем (краситель прокрашивает всю биомассу), исследованы с помощью поляризованной световой микроскопии. При скрепленных поляризаторах в них обнаруживаются яркие пятна желтого/зеленого двулучепреломления (рис. 3г–3з), характерные для комплекса красителя с амилоидными структурами (Nilsson, 2004). Не вся

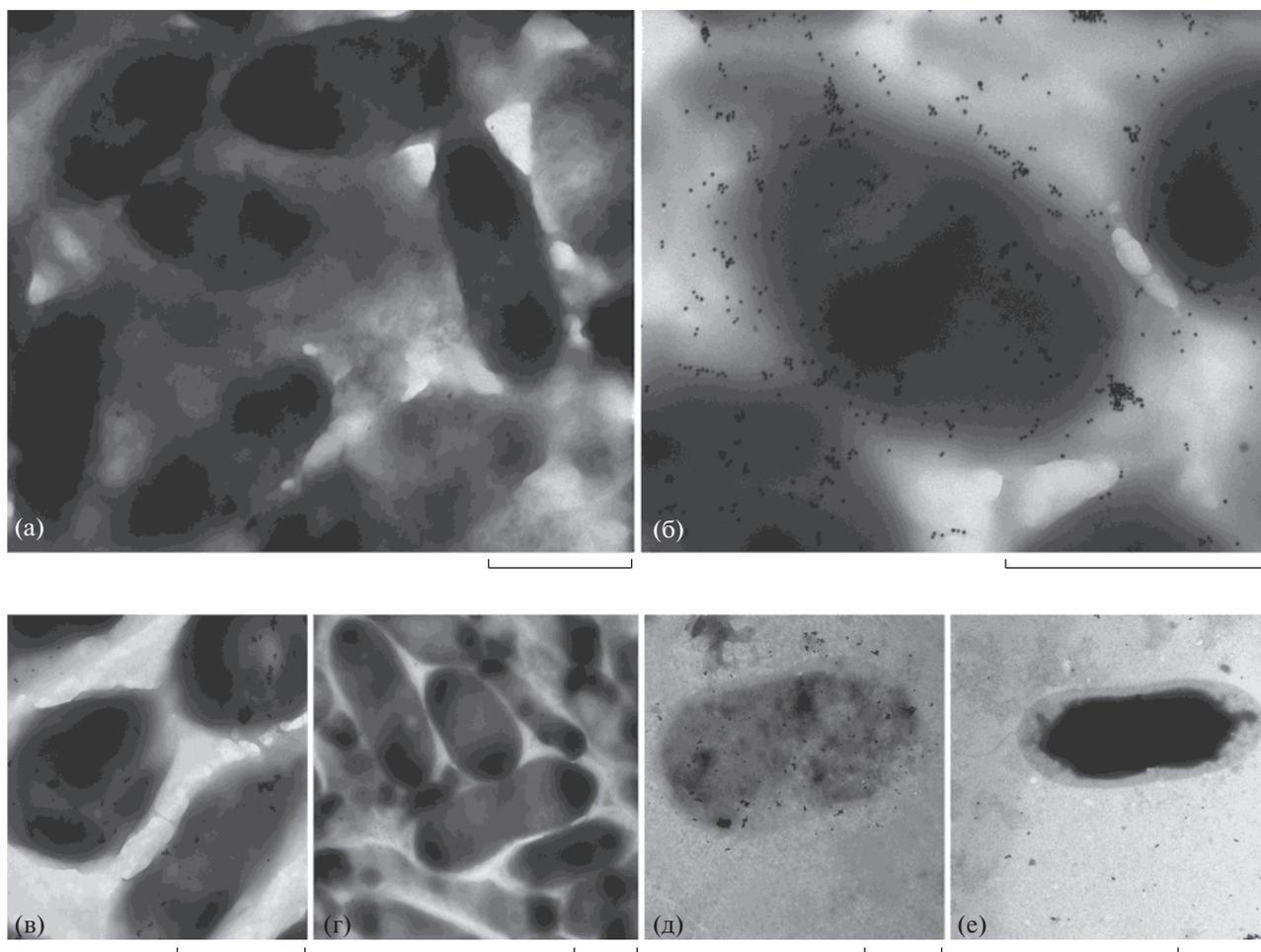


Рис. 5. Просвечивающая электронная микроскопия фрагментов биопленок *A. brasilense* Sp245 (а–г) и клеток из планктонных 18-ч культур (д, е) после инкубации с АЗП-К315 (б, в, д), АЗП-К315 + хитотриоза (г, е) или напыления золота (а). Бактерии и биопленки культивировали в жидкой LB. АЗП-К315 – конъюгат коллоидного золота (размер частиц 15 нм) с агглютинином зародышей пшеницы (АЗП). Масштабная линейка соответствует 1 мкм.

окрашенная конго красным биомасса биопленок азоспирилл демонстрирует подобный эффект. Локализация желтого/зеленого двулучепреломления соответствует окрашенным конго бактериальным агрегатам (рис. 3г–3з). В неокрашенных биопленках или в растворе красителя такое двулучепреломление при микроскопии отсутствует.

Анализ микроструктуры биопленок азоспирилл. С помощью просвечивающей электронной микроскопии исследованы биопленки родительского штамма, которые по сравнению с пленками мутантов более устойчивы к таким воздействиям, как гидродинамический сдвиг (Шелудько и соавт., 2015), что существенно упрощает подготовку препаратов для микроскопии. Напыление тонкого слоя золота на высушенные препараты биопленок позволило повысить контраст матрикса, в который погружены клетки (рис. 5а). Для анализа распределения в матриксе внеклеточных гликанов использовали в качестве зонда конъюгат коллоид-

ного золота с агглютинином зародышей пшеницы (АЗП-К315), специфичный к *N*-ацетил-*D*-глюкозамину (Lotan, Sharon, 1973; Kamnev, 2013). Возможность использования АЗП в качестве эффективного зонда для выявления внеклеточных полисахаридов азоспирилл обусловлена отсутствием взаимодействия данного лектина с отмытыми от экзополисахаридов и капсулы клетками азоспирилл (Skvortsov, Ignatov, 1998). Электронная микроскопия биопленок, меченных АЗП-К315, показала, что зонд распределяется по всей поверхности препарата, образуя неоформленные скопления и/или короткие полосы (рис. 5). Частицы АЗП-К315 также взаимодействуют с “мостиками” матрикса, соединяющими клетки (рис. 5б). Стоит отметить, что АЗП-К315 метит не все подобные структуры (рис. 5б, 5в). В контрольных образцах с заблокированным хитотриозой активным центром АЗП частицы К315 не связываются с биопленками, как и с поверхностью планктонных клеток

(рис. 5г, 5е). Полученные результаты электронной микроскопии свидетельствуют о присутствии в составе матрикса зрелых биопленок компонентов, имеющих в составе углеводный гаптен, обладающий сродством к АЗП. Сродство к данному лектину проявляют содержащие глюкозамин липополисахарид-белковый (ЛПБК) и полисахарид-липидный (ПСЛК) комплексы капсулы, экзополисахариды азоспирилл из жидких планктонных культур (Skvortsov, Ignatov, 1998). Перечисленные комплексы капсульных гликополимеров клеток Sp245 и ЛПС их внешней мембраны содержат идентичные антигенные детерминанты (Матора, Щеголев, 2002). После сравнения матрикса зрелых биопленок и мембранных липополисахаридов этого штамма (в случае мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 получены аналогичные данные) нами выявлен общий антиген.

Таким образом, результаты электронной микроскопии и иммунохимических исследований согласуются и свидетельствуют о наличии компонентов сложных комплексов гликополимеров капсулы в составе матрикса зрелых биопленок.

Особенности взаимодействия анионных красителей калькофлуора и конго красного с биомассой биопленок указывают на наличие в ее составе ПССК – глюканов. Красители сохраняются в составе биомассы после удаления с помощью ФБ (рН 7.0) легкосмываемых компонентов, что может свидетельствовать как о внеклеточной локализации глюканов (в составе матрикса биопленок), так и об их внутриклеточной локализации. Внутриклеточно могут быть локализованы глюканы, выполняющие у азоспирилл функцию осморегуляции (Altabe et al., 1994). В составе экстраклеточных полисахаридов азоспирилл глюканы появляются после 2–3 сут выращивания (Del Gallo, Naegi, 1990). В данном временном промежутке завершается процесс адгезии азоспирилл, формирующих биопленку на колонизируемой поверхности (Шелудько и соавт., 2015). В зрелой биопленке глюканы/ПССК наряду с комплексами, в составе которых присутствует ЛПС и белковые структуры, фиксируют ее и выполняют каркасную функцию – обеспечивают прикрепление бактерий друг к другу. В матриксе биопленок всех исследованных штаммов углеводсодержащие компоненты доминируют над белковыми составляющими. Гликополимеры опосредуют прикрепление биопленок преимущественно к поверхностям с гидрофильными свойствами, что наиболее очевидно в случае имеющих дефекты в образовании жгутиков мутантов по генам *flhB1*, *fabG1* и предполагаемому гену *mmsB1*. Биопленки этих производных, сформированные на стекле, после инкубации с окислителем гликополимеров теряют на 20–35% больше биомассы, чем Sp245.

Поверхность корня более гетерогенна, чем модельные поверхности стекла или полистирола, использованные нами в данной работе, и представлена, в частности, стенкой растительных клеток и муцигелем, сформированным полисахаридами и белками, выделяемыми растением. Агглютинин, присутствующий в корнях пшеницы, аналогичен лектину зародышей (Skvortsov, Ignatov, 1998). Наличие в составе матрикса биопленок азоспирилл гаптена АЗП указывает на то, что специфические лектин-углеводные взаимодействия могут являться неотъемлемой частью механизмов, опосредующих фиксацию зрелых бактериальных пленок на поверхности корня пшеницы.

Получены первичные косвенные данные о присутствии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы. Так, в окрашенных конго красным биопленках азоспирилл с помощью поляризованной световой микроскопии обнаруживаются яркие пятна желтого/зеленого двойного лучепреломления. Взаимодействие белковых структур с конго красным, вносящее определенный вклад в изменение спектра поглощения красителя, наряду с двойным лучепреломлением его комплекса с ними являются основными критериями первичной идентификации амилоидных фибрилл как *in vivo*, так и *in vitro* (Nilsson, 2004). Пили, курли (*curli*, от англ. *curl* – завиток), тафи (*tafi*, от англ. *thin aggregative fimbriae* – тонкие агрегирующие нити), гидрофобины класса I, адгезины и токсины микроорганизмов обладают свойствами амилоидов (Fowler et al., 2007; Плакунов и соавт., 2017; Jeter, Matthyse, 2005). Амилоиды широко распространены среди микробов и участвуют в самых различных процессах, в том числе необходимы для образования биопленок (Плакунов и соавт., 2017).

Авторы признательны В.А. Богатыреву за любезно предоставленное коллоидное золото и Б.Н. Хлебцову за помощь в проведении измерений методом флуоресцентной спектроскопии.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 16-04-01444 и 17-08-01696.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии // Успехи химии. 2007. Т. 76. № 2. С. 199–213.
- Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Gold nanoparticles: preparation, functionalization and applications in biochemistry and immunochemistry // Russ. Chem. Rev. 2007. V. 76. № 2. P. 181–205.
- Ковтунов Е.А., Петрова Л.П., Шелудько А.В., Кацы Е.И. Инсерция транспозона в хромосомную копию гена *flhB* сопровождается дефектами в образовании полярного и латеральных жгутиков у бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 // Генетика. 2013а. Т. 49. № 8. С. 1013–1016.

- Kovtunov E.A., Petrova L. P., Shelud'ko A.V., Katsy E. I. Transposon insertion into a chromosomal copy of *flhB* gene is concurrent with defects in the formation of polar and lateral flagella in the bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // Russ. J. Genet. 2013a. V. 49. P. 881–884.
- Ковтунов Е.А., Шелудько А.В., Чернышова М.П., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Мутанты бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 со вставкой омегона в генах липидного метаболизма *mmsB* или *fabG* дефектны по подвижности и жгутикованию // Генетика. 2013б. Т. 49. № 11. С. 1270–1275.
- Kovtunov E.A., Shelud'ko A.V., Chernyshova M.P., Petrova L.P., Katsy E.I. Mutants of bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 with Omegon insertion in *mmsB* or *fabG* genes of lipid metabolism are defective in motility and flagellation // Russ. J. Genet. 2013b. V. 49. P. 1107–1111.
- Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 1998. Т. 67. № 6. С. 815–820.
- Matora L.Yu., Shvartsburg B.I., Shchegolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* // Microbiology. 1998. V. 67. P. 677–681.
- Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 211–214.
- Matora L.Yu., Shchegolev S.Yu. Antigenic identity of the capsule lipopolysaccharides, exopolysaccharides, and O-specific polysaccharides in *Azospirillum brasilense* // Microbiology. 2002. V. 71. P. 178–181.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 402–420.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling of microbial biofilms formation: Anti- and probiofilm agents // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 423–428.
- Шелудько А.В., Кулибякина О.В., Широков А.А., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 3. С. 358–363.
- Sheludko A.V., Kulibyakina O.V., Shirokov A.A., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 313–317.
- Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Шумилова Е.М., Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84. № 2. С. 175–183.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Shumilova E.M., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 144–151.
- Шумилова Е.М., Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Евстигнеева С.С., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* 245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 2. С. 162–170.
- Shumilova E.M., Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Evstigneeva S.S., Ponomareva E.G., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in cell surface properties and biofilm formation efficiency in *Azospirillum brasilense* Sp245 mutants in the putative genes of lipid metabolism *mmsB1* and *fabG1* // Microbiology (Moscow). 2016. T. 85. P. 172–179.
- Altabe S.G., de Iannino N.I., de Mendoza D., Ugalde R.A. New osmoregulated β -(1–3), β -(1–6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense* // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 4890–4898.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. V. 29. P. 924–929.
- Bogino P.C., Oliva M.M., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 15838–15859.
- Del Gallo M., Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* // Symbiosis. 1990. V. 9. P. 155–161.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
- Fedonenko Yu.P., Zatonsky G.V., Konnova S.A., Zdrovenko E.L., Ignatov V.V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 869–872.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 326. P. 99–108.
- Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
- Fowler D.M., Koulov A.V., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid – from bacteria to humans // Trends in Biochem. Sci. 2007. V. 32. № 5. P. 217–224.
- Jeter C., Matthyse A.G. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts // Mol. Plant Microbe Interact. 2005. V. 18. P. 1235–1242.
- Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Gardiner P.H.Y. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: Comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense* // J. Trace Elem. Med. Biol. 2005. V. 19. P. 91–95.
- Kamnev A.A. Infrared spectroscopy in studying biofunctionalised gold nanoparticles // Eds. Fesenko O., Yatsenko L., Brodin M. / Nanomaterials Imaging Techniques, Surface Studies, and Applications (Springer Proceedings in Physics. V. 146). New York, NY: Springer, 2013. Ch. 3. P. 35–50.

- Lotan R., Sharon N. The fluorescence of wheat germ agglutinin and of its complexes with saccharides // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 55. P. 1340–1346.
- 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. V. 28. P. 449–461.
- Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro* // Methods. 2004. V. 34. P. 151–160.
- Plasek J., Hoskova B. Solvatochromic effect in the optical spectra of calcofluor and its relation to fluorescent staining of yeast cell walls // J. Fluoresc. 2010. V. 20. P. 343–352.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible interaction with plant roots // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 165. P. 223–229.
- Tugarova A.V., Shelud'ko A.V., Dyatlova Yu.A., Filip'echeva Yu.A., Kamnev A.A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // J. Mol. Struct. 2017. V. 1140. P. 142–147.
- Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L.Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // ISME J. 2017. V. 11. P. 1602–1613.
- Wood P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides // Carbohydr. Res. 1980. V. 85. P. 271–287.

Characterization of Carbohydrate-Containing Components of *Azospirillum brasilense* Sp245 Biofilms

A. V. Shelud'ko^{1,*}, Yu. A. Filip'echeva¹, E. M. Telesheva¹, A. M. Burov¹, S. S. Evstigneeva¹,
G. L. Burygin¹, and L. P. Petrova¹

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia*

*e-mail: shel71@yandex.ru

Received February 16, 2018

Abstract—The structure and functions of the biopolymers of the matrix of *Azospirillum brasilense* biofilms formed at the liquid–solid interface were studied. Calcofluor-binding polysaccharides (CBPS) and the complexes containing lipopolysaccharides (LPS) and proteinaceous structures were shown to fix mature biofilms on solid surfaces and to perform a framework function. The matrix of mature biofilms contained a carbohydrate hapten with a specific affinity to wheat germ agglutinin (WGA), which is important for associative interaction and plant root colonization. The carbohydrate components, predominating over the proteinaceous matrix components, mediate preferable biofilm attachment to hydrophilic surfaces, which is especially evident in the case of *A. brasilense* Sp245 with impaired flagella formation. This is the first report on the presence of amyloid structures in the biomass of *Azospirillum* biofilms.

Keywords: biofilms, matrix, polysaccharides, LPS, Calcofluor, Congo red, wheat germ agglutinin, amyloids

ЭФФЕКТ ИОНОВ ЛЕГКИХ МЕТАЛЛОВ И ХЛОРИДА НА АКТИВНОСТЬ УМЕРЕННО-ТЕРМОФИЛЬНЫХ АЦИДОФИЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2018 г. А. Г. Булаев^{a, b, *}, А. Н. Чернышов^b

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

^bИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.01.2018 г.

Изучен эффект ионов натрия, калия, магния и алюминия, а также хлорид-иона на рост умеренно-термофильных железоокисляющих ацидофилов и окисление ими двухвалентного железа. Объектами исследования были представители доминирующих в биогидрометаллургических процессах групп микроорганизмов: штаммы бактерий р. *Sulfobacillus* и археи р. *Acidiplasma*. Исследована способность этих штаммов расти и окислять двухвалентное железо в средах, содержащих различные концентрации ионов натрия, калия, магния и алюминия (до 1000 мМ). Эксперименты проводили в двух вариантах: в первом – при внесении в среду сульфатов исследуемых металлов, а во втором – хлоридов. Было установлено, что исследованные металлы не очень значительно различались своим ингибирующим воздействием на исследованные штаммы, а в высоких концентрациях ингибировали рост микроорганизмов и окисление ими железа. При этом штаммы р. *Acidiplasma* были более устойчивы к исследуемым катионам, чем штаммы р. *Sulfobacillus*. Хлорид-ион оказывал наиболее значительное ингибирующее воздействие на исследуемые штаммы, которые, очевидно, приспособлены к существованию в местах обитания, характеризующихся высокими концентрациями металлов и сульфатов, но не хлоридов. Обсуждаются механизмы действия исследованных ионов легких металлов и хлорида на рост железоокисляющих ацидофилов.

Ключевые слова: биогидрометаллургия, ацидофильные микроорганизмы, *Acidiplasma*, *Sulfobacillus*, ионы металлов, хлорид-ион

DOI: 10.1134/S0026365618050051

Для переработки минерального сырья, содержащего сульфидные минералы, в настоящее время по всему миру используются биогидрометаллургические технологии, основанные на активности ацидофильных микроорганизмов, окисляющих соединения серы и двухвалентное железо. В промышленных реакторах биоокисления и при кучном выщелачивании происходит разогрев пульпы и рудного штабеля до температур 40–50°C, так как реакции окисления сульфидных минералов происходят с выделением тепла. Поэтому в промышленных процессах обычно доминируют умеренно термофильные и термотолерантные микроорганизмы. Состав микробных сообществ, осуществляющих процессы биоокисления, может различаться из-за воздействия различных факторов (Кондратьева и соавт., 2015), однако в целом ряде работ было показано, что в технологических процессах биоокисления сульфидных руд и концентратов зачастую доминируют бактерии р. *Sulfobacillus* и археи сем. *Ferroplasmaceae* (рр. *Acidiplasma*

и *Ferroplasma*) (Hawkes et al., 2006; Zhou et al., 2008; Li et al., 2011; van Hille et al., 2011; Muravyov, Bulaev, 2013). Представители обеих групп являются экстремально ацидофильными умеренно-термофильными аэробными окислителями железа и нуждаются в органическом источнике углерода в среде для стабильного роста (Golyshina et al., 2000; Golyshina, Timmis, 2005; Schippers, 2007; Golyshina et al., 2009). При культивировании данных микроорганизмов используют среды, содержащие двухвалентное железо и дрожжевой экстракт, а при окислении сульфидных минералов в природных и промышленных экотопах они потребляют метаболиты автотрофных микроорганизмов (Кондратьева и соавт., 2015).

На формирование микробных сообществ, осуществляющих процессы биоокисления сульфидных руд и концентратов, оказывают влияние различные факторы – температура, pH, ионы растворенных металлов, присутствие различных примесей в воде и т.д. (Кондратьева и соавт.,

2015). Одним из факторов, влияющих на активность микроорганизмов в процессах биоокисления сульфидных руд, являются высокие концентрации катионов металлов и мышьяка в среде, так как в процессе биоокисления сульфидных минералов они выходят в раствор (Dopson et al., 2014), а также различных анионов и катионов (Rea et al., 2015; Suzuki et al., 1999). Растворенные в рудничных водах ионы могут ингибировать активность микроорганизмов, осуществляющих процессы биовыщелачивания. Основным интерес исследователей вызывает устойчивость микроорганизмов к ионам тяжелых металлов и мышьяка, тогда как вопросам ингибирования ионами щелочных и щелочноземельных металлов посвящено меньшее число работ. Показано, что ионы калия, магния, натрия, алюминия, входящие в состав несulfидных минералов сульфидных руд, могут растворяться в процессах биовыщелачивания и накапливаться в продуктивных растворах (Bhatti et al., 2012). В обзоре (Watling et al., 2010), приводятся обобщенные данные о составе продуктивных растворов биовыщелачивания, которые могут содержать до 1350 мМ сульфат-ионов, 800 мМ магния и 900 мМ алюминия. При этом концентрация ионов может постепенно нарастать не только из-за растворения минералов, но и вследствие испарения воды из технологических растворов. Кроме того, зачастую в регионах с недостатком пресной воды для технологических операций вынужденно используют подземные воды с высокими содержанием различных ионов (Davis-Belmar et al., 2013), а некоторые сульфидные руды богаты хлоридом натрия (в виде галита), который растворяется в процессе биовыщелачивания руд, что может привести к ингибированию микроорганизмов (Pakostova et al., 2017). Также в составе смешанных медных сульфидных руд (т.е. содержащих медь как в сульфидных, так и в оксидных минералах) может встречаться такой минерал как атакамит ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$), растворение которого при выщелачивании также приводит к выходу в раствор хлорид-ионов (Watling et al., 2010; Bobadilla-Fazzini et al., 2014).

Для *Acidithiobacillus thiooxidans* было показано, что хлориды натрия и калия ингибировали его рост в большей степени, чем сульфаты, что, возможно, указывает на больший ингибирующий эффект хлорида по сравнению с сульфатом на исследуемую бактерию (Suzuki et al., 1999).

Следует отметить, что несмотря на ингибирующий рост микроорганизмов эффект хлорид-ионов, биовыщелачивание в растворах с высоким содержанием хлорида может проходить со значительным ускорением процессов окисления наиболее распространенного рудного минерала меди – халькопирита (CuFeS_2) (Bevilaqua et al., 2013; Bobadilla-Fazzini et al., 2014; Watling et al., 2014). В работе Davis-Belmar et al. (2013) было даже

предложено использовать морскую воду для ускорения процесса биовыщелачивания меди. Таким образом, показано, что, с одной стороны, присутствие некоторых ионов (например, хлорида) может способствовать ускорению процесса выщелачивания металлов из руд, а с другой – создавать опасность ингибирования активности микроорганизмов, осуществляющих биоокисление сульфидных минералов. Поэтому данные о пределах устойчивости микроорганизмов, осуществляющих технологические процессы, к различным катионам и анионам необходимы для планирования биотехнологических процессов.

Среди ацидофильных микроорганизмов, окисляющих сульфидные минералы, известны слабые галофилы и умеренные осмофилы, представители сем. *Ectothiorhodospiraceae* – *Acidihalobacter prosperus* (ранее *Thiobacillus prosperus*) (Huber, Stetter, 1989; Cardenas et al., 2015) и *Acidiferrobacter thiooxydans* (Hallberg et al., 2011). Оба микроорганизма являются термотолерантными мезофилами, верхние пределы роста для *A. prosperus* и *A. thiooxydans* составляют 41 и 47°C соответственно. Было показано, что штаммы *A. prosperus* нуждаются в присутствии в среде хлорида натрия, способны расти при его содержании до 1 М, а оптимальная концентрация хлорида натрия для них составляет 340–800 мМ (Davis-Belmar et al., 2008; Dopson et al., 2017). Для *Acidiferrobacter thiooxydans*, для которого в настоящее время известен один культивируемый штамм этого рода, было показано, что хотя он нуждается в присутствии в среде относительно высоких концентраций солей для стабильного роста, пределы его устойчивости к различным ионам относительно невысоки (Hallberg et al., 2011). В присутствии 0.5% (86 мМ) NaCl в среде штамм рос значительно быстрее, чем в среде без хлорида натрия (подробные данные в статье не приводятся), но не был способен расти при концентрации хлорида натрия 1% (170 мМ). Авторы отметили, что внесение в среду KCl, Na_2SO_4 и K_2SO_4 привело к сходному результату. Подробно было исследовано влияние сульфата магния на рост данного микроорганизма. Как было показано, концентрации данной соли в диапазоне от 50 до 200 мМ ускоряли рост штамма, а оптимальное содержание сульфата магния составило 100 мМ.

Данных по устойчивости к ионам легких металлов и хлорида умеренно термофильных железобактерий (р. *Sulfobacillus* и архей сем. *Ferroplasmaceae*) в литературе относительно немного. Например, в работе Simmons, Norris (2002) исследовали свойства изолятов, выделенных из проб влажного теплого (40–45°C) вулканического песка из района залива Порто ди Леванте (остров Вулькано, Эолийские острова, Тирренское море, Италия). Нужно отметить, что одним из преобладающих видов в пробах воды и осадков, исследованных в данной работе, был слабый галофил *A. prosperus* (Cardenas et al.,

2015; Dopson et al., 2017). Было показано, что изоляты, выделенные на среде с двухвалентным железом и дрожжевым экстрактом и филогенетически близкие к типовому штамму *S. thermosulfidooxidans*, росли в присутствии 2% NaCl в среде. К сожалению, более подробных данных о влиянии хлорида натрия на рост этих микроорганизмов в статье не представлено. Интересно отметить, что из пробы воды, отобранной на том же острове, был впоследствии выделен типовой штамм р. *Acidiplasma* — *A. aeolicum* V^T (Golyshina et al., 2009). В работе Keeling et al. (2006) были исследованы свойства изолятов, выделенных из проб медной руды. Было показано, что умеренно-термофильный изолят, филогенетически близкий к *S. thermosulfidooxidans*, был способен расти в присутствии 1 г/л (17 мМ), но не рос в присутствии 3 г/л (51 мМ) хлорида натрия. В работе Korehi et al. (2013), в которой были исследованы микроорганизмы хранилища отходов обогащения, содержащих пирит, было показано, что накопительная культура железooksисляющих микроорганизмов обладала способностью окислять железо в присутствии 1000 мМ NaCl. Необходимо отметить, что в этих условиях общая численность клеток в процессе окисления железа не увеличивалась. Доминировали в данной культуре микроорганизмы р. *Acidiphilium*, присутствовали также и представители р. *Sulfobacillus*. Так как изменения относительной численности микроорганизмов различных групп, представленных в накопительной культуре, в процессе окисления железа не были определены, то по представленным в статье данным невозможно судить о пределах устойчивости представителей р. *Sulfobacillus* к хлориду натрия, а также о влиянии данной соли на активность этих микроорганизмов. В работе Wang et al. (2012) было показано, что штамм *Sulfobacillus* sp. TPY был способен проводить процесс биоокисления в присутствии 2% (340 мМ) NaCl, причем эта концентрация хлорида натрия в среде практически не оказывала влияния на рост микроорганизма. При этом 3% (510 мМ) концентрация NaCl в значительной степени подавляла рост микроорганизма — его урожайность снижалась по сравнению с контролем (7×10^7 и 25×10^7 кл./мл соответственно). В этой же работе (Wang et al., 2012) исследовали влияние NaCl на рост штамма *F. thermophilum* L1, который был описан как представитель р. *Ferroplasma*, но согласно действующим правилам таксономии должен быть отнесен к р. *Acidiplasma*. Было показано, что NaCl в концентрации до 0.35% (60 мМ) практически не влиял на данный микроорганизм, однако 0.7% NaCl почти полностью ингибировали его рост. Численность клеток в присутствии 0.7% (120 мМ) хлорида натрия практически не изменилась за 6 сут эксперимента, тогда как в контроле она возросла с 1 до 20×10^7 кл./мл. В работе Rea et al. (2015) исследовали

устойчивость штаммов сульфобацилл к хлориду натрия, сульфату магния и морской соли в смешанных культурах. Было показано, что смешанные культуры, содержащие штаммы *S. thermosulfidooxidans* VKMV 1269^T (DSM 9293^T), *S. sibiricus* N1^T (DSM 17363^T) и *S. thermotolerans* Kr1^T (DSM 17362^T), а также штаммы *Acidicaldus organivorans* DSM 16953^T, *Acidithiobacillus caldus* DSM 8584^T, *Acidianus briereleyi* DSM 1651^T, *Metallosphaera hakonensis* и *Sulfolobus metallicus* DSM 6482^T были устойчивы к 225 г/л сульфата магния (примерно 920 мМ). Для проверки устойчивости смешанные культуры подвергались многократным пересевам на среду, содержащую в качестве питательных субстратов двухвалентное железо, серу и пирит. При этом относительная численность штаммов в смешанных культурах не контролировалась, т.е. судить об эффекте сульфата магния на отдельные штаммы по представленным данным нельзя. В этой же работе была исследована устойчивость штаммов *S. thermosulfidooxidans* VKMV 1269^T (DSM 9293^T) и *Ferroplasma acidiphilum* Y1^T (DSM 12658^T) к хлориду натрия (штаммы были способны расти в присутствии 14 г/л (230 мМ) и 24 г/л (400 мМ) NaCl соответственно). Авторы отметили, что полученные значения несколько отличались от полученных в работе Zammit et al. (2012) — 20 г/л (300 мМ) для обоих штаммов, однако эти различия могли быть обусловлены различиями в методике проведения экспериментов.

Целью данной работы являлось изучение устойчивости штаммов бактерий р. *Sulfobacillus* и архей рода *Acidiplasma* к ионам натрия, калия, магния и алюминия, а также к хлорид-иону.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были штаммы *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1; *S. sibiricus* N1^T (DSM 17363^T), *S. thermotolerans* Kr1^T (DSM 17362^T); *Acidiplasma* sp. MBA-1; *A. aeolicum* V^T; *A. cupricumulans* BH2^T. В экспериментах использовали среду, содержащую минеральные соли (сульфат аммония, фосфат калия, хлорид калия, сульфат магния), а также 0.02% дрожжевого экстракта, так как все исследуемые штаммы способны окислять двухвалентное железо, но нуждаются в органическом источнике углерода; pH среды был близок к оптимальному для исследуемых штаммов: около 1 — для штаммов *Acidiplasma* sp. MBA-1 и *A. cupricumulans* BH2^T; 1.5–1.6 для штаммов *A. aeolicum* V^T, *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. sibiricus* N1^T, *S. thermotolerans* Kr1^T. Эксперименты проводили при температурах, близких к оптимальным для роста микроорганизмов: 50°C — для штаммов *Acidiplasma* sp. MBA-1, *A. cupricumulans* BH2^T, *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1, *S. sibiricus*

$N1^T$; $40^\circ C$ — для штаммов *A. aeolicum* V^T и *S. thermotolerans* $Kr1^T$.

Максимальная продолжительность экспериментов составляла 96 ч, пробы для анализа отбирали через 48 и 96 ч после начала эксперимента, эксперимент заканчивали в том случае, если в среде полностью окислялось двухвалентное железо. Штаммы культивировали на ротационном шейкере (200 об./мин.) в пеницилиновых флаконах с 3 мл среды. Штаммы инокулировали таким образом, чтобы начальная численность клеток составила примерно 1×10^7 кл./мл. В экспериментах по исследованию влияния катионов калия, натрия, магния, алюминия, а также хлорид-ионов на рост штаммов и окисление двухвалентного железа использовали среду, содержащую около 100 мМ двухвалентного железа, а также различные концентрации катионов исследуемых металлов (25, 50, 100, 250 500, 750, 1000 мМ). Эксперимент проводили в двух вариантах. В первом варианте в среду вносили сульфаты исследуемых металлов, а во втором — хлориды. В контроле в среду не вносили дополнительное количество катионов металлов. Следует отметить, что используемая среда содержала некоторые количества калия, магния и хлорида, г/л: $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ — 0,4, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2, KCl — 0,1, K_2HPO_4 — 0,1, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ — 28), однако они очень малы по сравнению с использованными в опытных вариантах. Содержание калия, магния и хлорида в контрольной среде составляло 2,5, 1,6 и 1,3 мМ соответственно. Кроме того, среды с рН 1 и 1,5 содержали соответственно 220 и 150 мМ сульфат-иона. Содержание сульфатов и хлоридов в средах, использованных в данном исследовании, приведено в таблице.

О воздействии ионов на микроорганизмы судили по окислению двухвалентного железа и росту микроорганизмов в различных условиях, определяя концентрации ионов трех- и двухвалентного железа с помощью трилонометрического титрования (Резников и соавт., 1970), а численность микроорганизмов — прямым счетом с помощью фазово-контрастной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения численности клеток исследуемых штаммов и доли окисленного двухвалентного железа представлены на рис. 1–6.

S. thermosulfidooxidans SH 10-1 (рис. 1) за 48 ч практически полностью окислил железо в средах, содержащих до 250 мМ натрия, калия и магния в виде сульфатов, а также в среде, содержащей 500 мМ алюминия в виде сульфата. За 96 ч штамм также полностью окислил железо в вариантах с 500 мМ калия и натрия, однако в эксперименте с 500 мМ магния за 48 и 96 ч штамм окислил только

около 60 и 80% железа соответственно. В вариантах с концентрациями катионов 750 и 1000 мМ окисление железа было незначительным — порядка 20–30%. Хлориды металлов при концентрациях, соответствующих концентрациям натрия, калия и магния до 250 мМ, ингибировали окисление железа не намного сильнее, чем сульфаты. Железо в вариантах эксперимента с хлоридами натрия, калия и магния окислялось несколько медленнее, чем в присутствии сульфата (было окислено около 80–90% железа). Хлориды металлов при концентрациях, соответствующих 500 мМ натрия, калия и магния, ингибировали окисление железа намного сильнее, чем сульфаты: было окислено около 20% железа, при этом доля окисленного железа не менялась значительно в интервале от 48 до 96 ч. Хлорид алюминия в концентрациях, соответствующих концентрациям Al^{3+} выше 100 мМ, почти полностью подавлял окисление железа (было окислено не более 20% железа за время эксперимента). Внесение катионов металлов в среду оказывало эффект и на рост штамма. Сульфат натрия в концентрациях, соответствующих концентрациям иона натрия до 500 мМ, не оказывал значительного влияния на численность клеток штамма, которая в этих экспериментах достигала примерно $2-3 \times 10^8$ кл./мл. При концентрации ионов натрия выше 500 мМ рост фактически отсутствовал. Хлорид натрия почти полностью ингибировал рост при концентрациях выше 500 мМ. Ионы калия в экспериментах и с сульфатом, и с хлоридом в концентрациях выше 50 мМ ингибировали рост штамма. В экспериментах с магнием рост почти полностью подавлялся в экспериментах и с сульфатом, и с хлоридом при концентрациях выше 250 мМ, несмотря на то, что при 500 мМ Mg^{2+} железо окислялось достаточно быстро. Хлорид алюминия в концентрациях, соответствующих 100 мМ Al^{3+} и выше, почти полностью подавлял рост штамма, тогда как рост в присутствии сульфата алюминия не ингибировался вплоть до концентрации 500 мМ Al^{3+} . При 500 мМ рост отсутствовал, несмотря на активное окисление железа.

S. sibiricus $N1^T$ (рис. 2) за 48 ч практически полностью окислил железо в средах, содержащих до 750 мМ натрия и магния в виде сульфатов. При этом он также полностью окислял железо в среде, содержащей 500 мМ алюминия и калия в виде сульфата. За 48 и 96 ч окисление железа при более высоких концентрациях сульфатов этих металлов оставалось незначительным (30–40%). Хлориды металлов при концентрациях, соответствующих концентрациям натрия, калия и магния выше 100 мМ ингибировали окисление железа намного сильнее, чем сульфаты. Было окислено 20–40% железа за 48 ч и до 60–80% за 96 ч при концентрациях сульфатов, соответствующих 250 мМ натрия, ка-

Таблица 1. Концентрации сульфат- и хлорид-ионов в средах, использованных в экспериментах

Катион	Концентрация, мМ	Среда			
		рН 1		рН 1.5	
		концентрация аниона, мМ		концентрация аниона, мМ	
		SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻
Контроль	0	220	1.3	150	1.3
Na ⁺	25	232.5	26.3	162.5	26.3
	50	245	51.3	175	51.3
	100	270	101.3	200	101.3
	250	345	251.3	275	251.3
	500	470	501.3	400	501.3
	750	595	751.3	525	751.3
	1000	720	1001.3	650	1001.3
K ⁺	25	232.5	26.3	162.5	26.3
	50	245	51.3	175	51.3
	100	270	101.3	200	101.3
	250	345	251.3	275	251.3
	500	470	501.3	400	501.3
	750	595	751.3	525	751.3
	1000	720	1001.3	650	1001.3
Mg ²⁺	25	245	51.3	175	51.3
	50	270	101.3	200	101.3
	100	320	201.3	250	201.3
	250	470	501.3	400	501.3
	500	720	1001.3	650	1001.3
	750	970	1501.3	900	1501.3
	1000	1220	2001.3	1150	2001.3
Al ³⁺	25	257.5	76.3	187.5	76.3
	50	295	151.3	225	151.3
	100	370	301.3	300	301.3
	250	595	751.3	525	751.3
	500	970	1501.3	900	1501.3
	750	1345	2251.3	1275	2251.3
	1000	1720	3001.3	1650	3001.3

лия и алюминия. При концентрации катионов выше 250 мМ в экспериментах с хлоридами доля окисленного железа не превышала 20%. Хлорид алюминия в концентрациях, соответствующих концентрациям Al³⁺ выше 50 мМ почти полностью подавлял окисление железа (было окислено не более 20% железа за время эксперимента). Соответствующим образом ионы подавляли и рост штамма. Численность клеток снижалась, но оставалась достаточно высокой (около 1 × 10⁸ кл./мл при 3 × 10⁸ кл./мл в контроле) вплоть до концентраций сульфата и хлорида натрия, соответствующих 750 и

100 мМ Na⁺, 250 и 100 мМ K⁺, 750 и 100 мМ Mg²⁺ и 500 и 25 мМ Al³⁺ соответственно.

S. thermotolerans K1^T (рис. 3) за 48 ч практически полностью окислил железо в средах, содержащих до 500 мМ натрия, калия, магния и алюминия в виде сульфатов. Во всех этих вариантах за 48 ч железо окислилось полностью, за исключением эксперимента с 500 мМ сульфата магния, где окислилось около 80 и 100% железа за 48 и 96 ч соответственно. Хлориды металлов при концентрациях, соответствующих концентрациям натрия и калия до 100 мМ почти не ингибировали

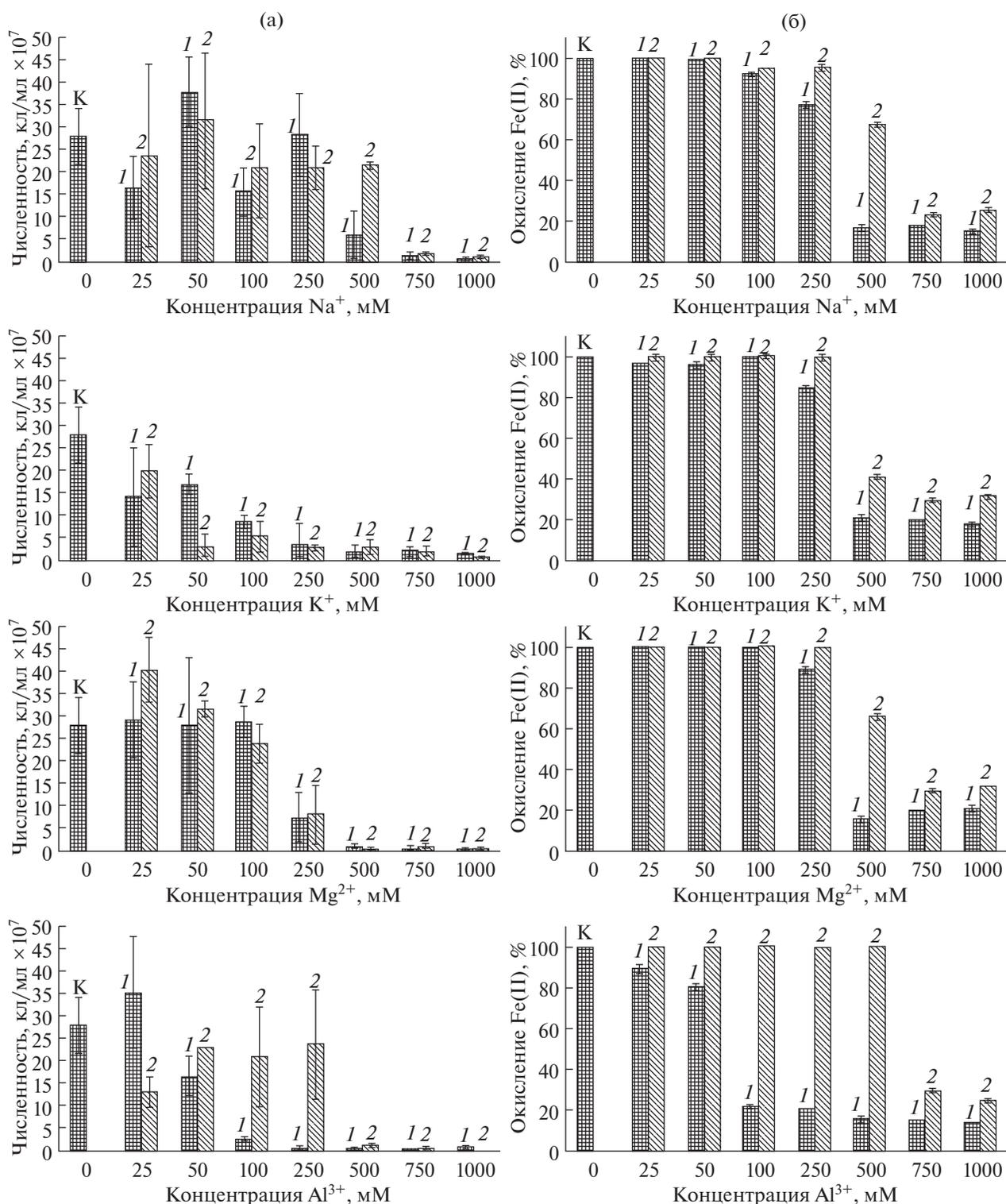


Рис. 1. Численность клеток штамма (а) *S. thermosulfidooxidans* SH 10-1 и окисление железа (б) в присутствии сульфатов (1) и хлоридов (2) натрия, калия, магния и алюминия (через 48 ч после начала эксперимента); К – контрольный вариант.

окисление железа, тогда как при более высоких концентрациях практически полностью его подавляли (было окислено не более 20% железа).

Хлориды магния и алюминия значительно ингибировали окисление железа уже в концентрациях, соответствующих концентрациям этих метал-

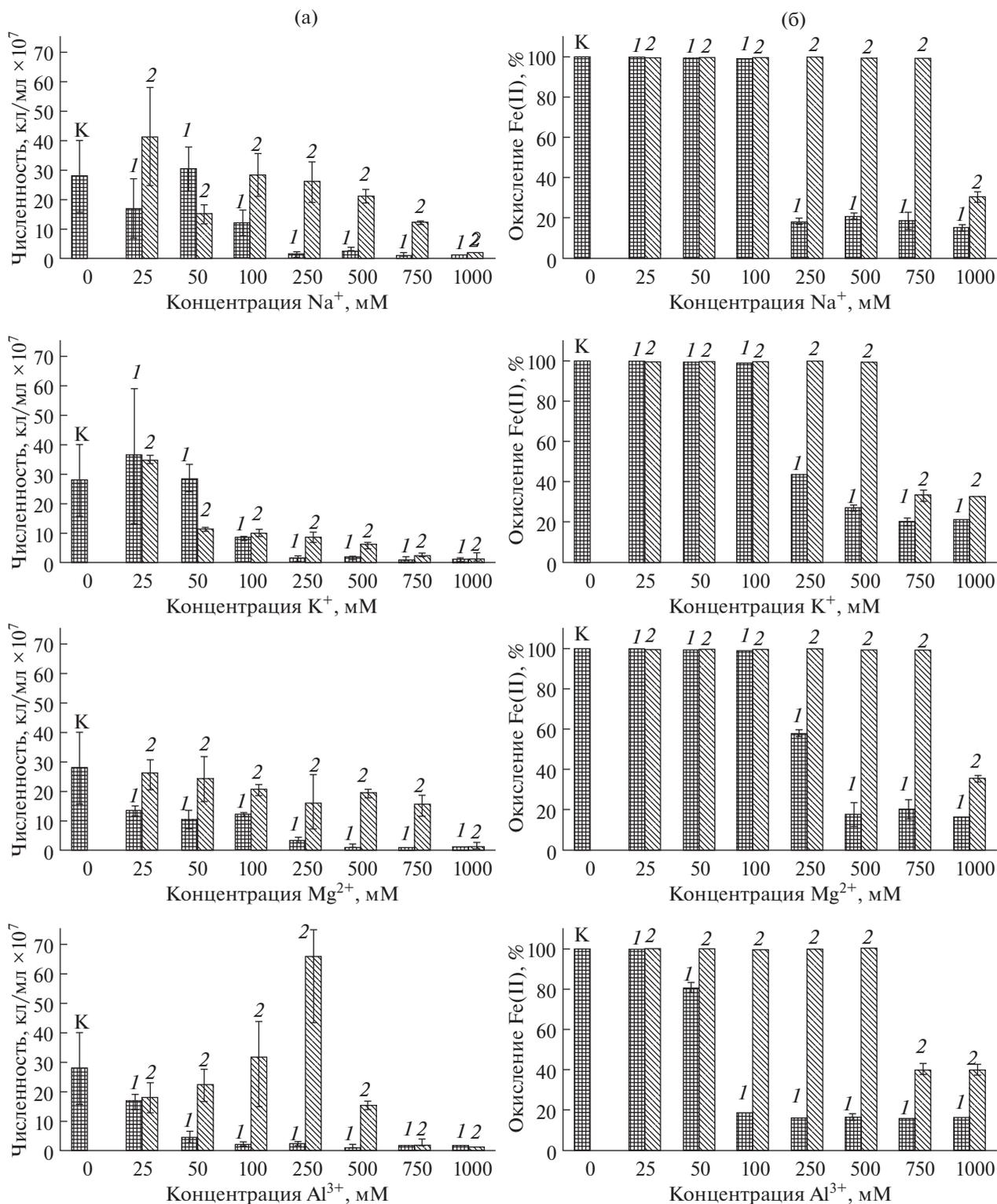


Рис. 2. Численность клеток штамма (а) *S. sibiricus* N1^T и окисление железа (б) в присутствии сульфатов (1) и хлоридов (2) натрия, калия, магния и алюминия (через 48 ч после начала эксперимента); К – контрольный вариант.

лов, превышающих 50 мМ. В случае штамма *S. thermotolerans* Kг 1^T рост почти отсутствовал при концентрациях ионов металлов, подавлявших окисление железа.

Штамм *Acidiplasma* sp. MBA-1 (рис. 4) за 48 ч практически полностью окислил железо в средах, содержащих 1000 мМ натрия, калия и магния в

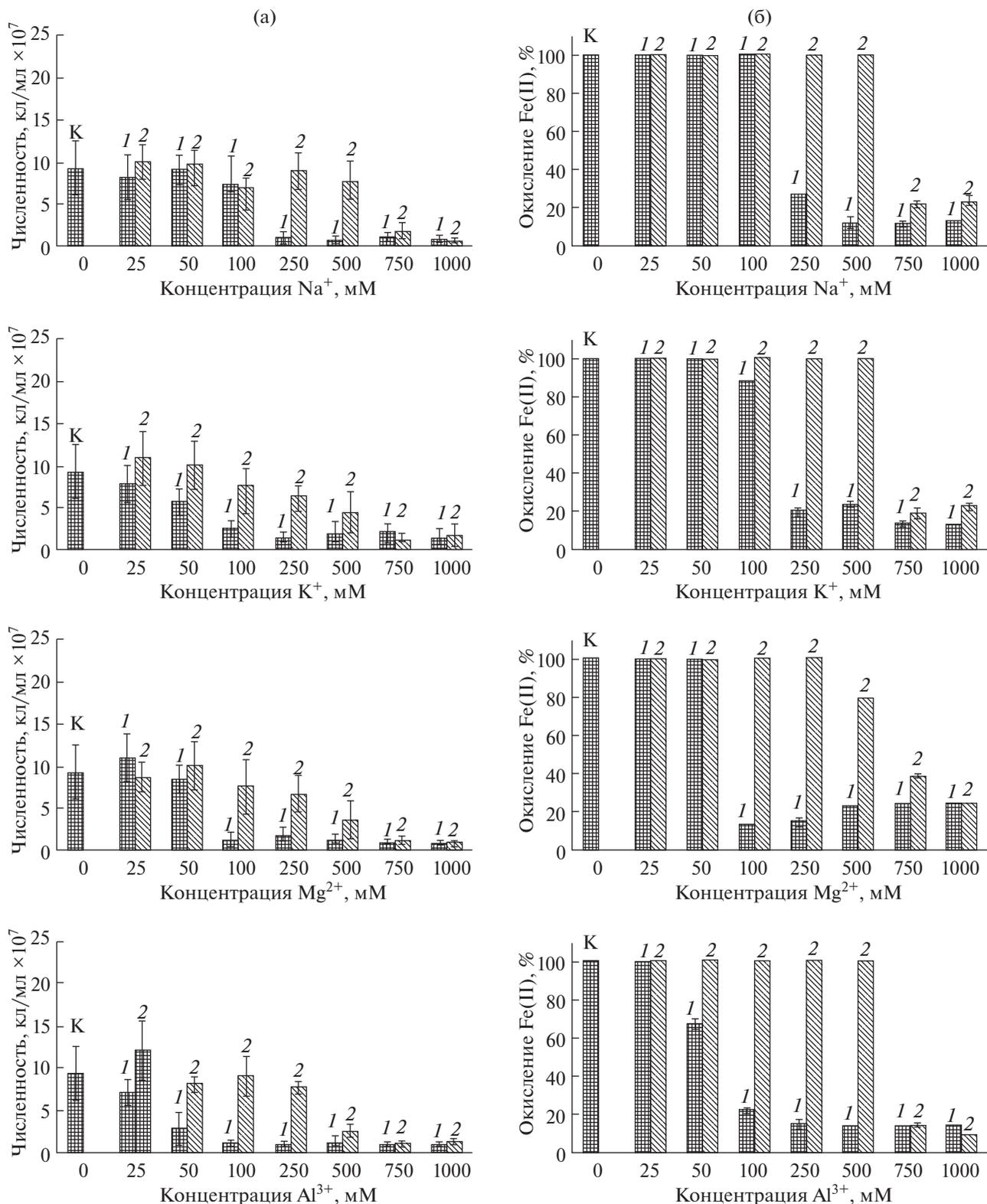


Рис. 3. Численность клеток штамма (а) *S. thermotolerans* Кг1^T и окисление железа (б) в присутствии сульфатов (1) и хлоридов (2) натрия, калия, магния и алюминия (через 48 ч после начала эксперимента); К – контрольный вариант.

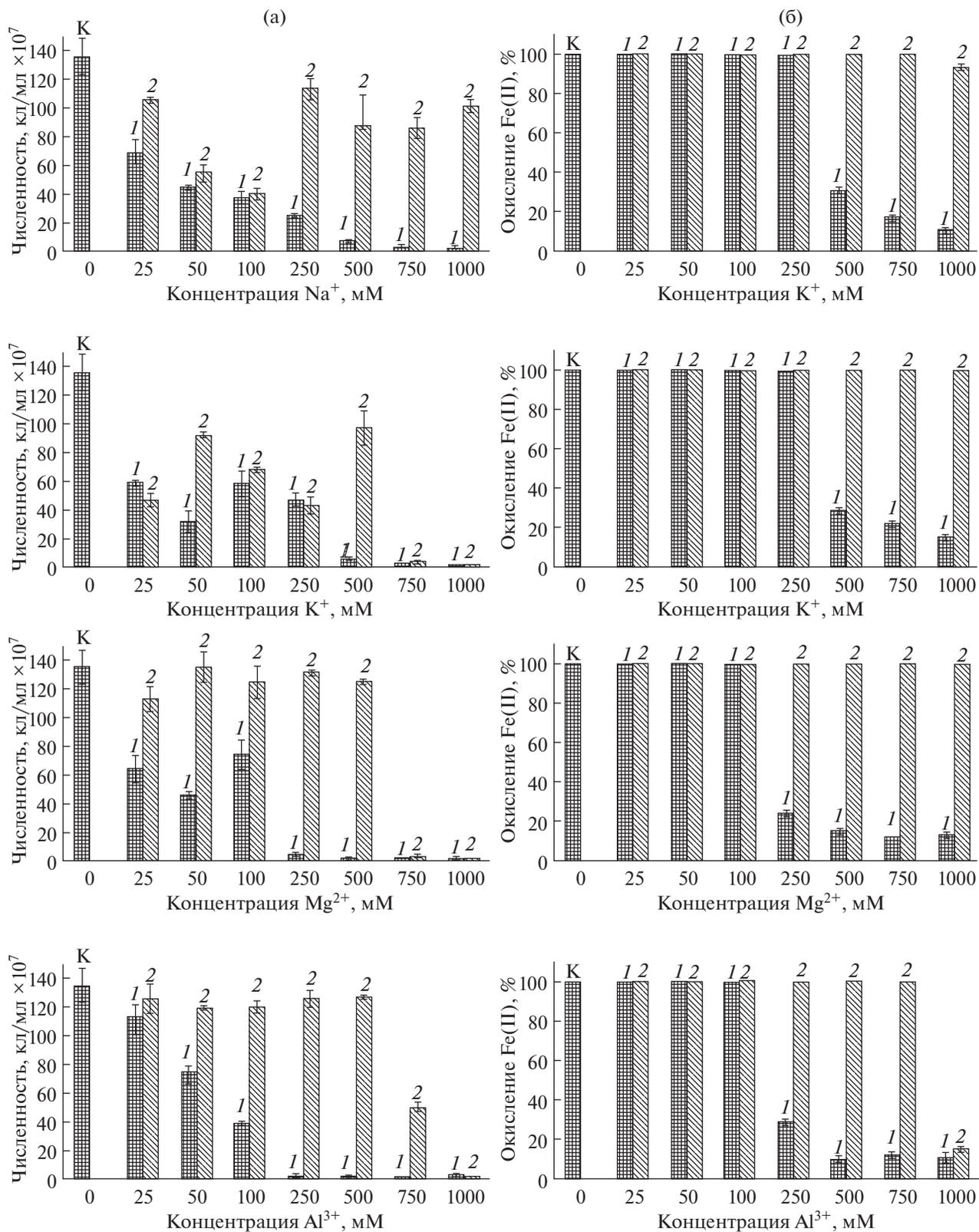


Рис. 4. Численность клеток штамма (а) *Acidiplasma* sp. MVA-1 и окисление железа (б) в присутствии сульфатов (1) и хлоридов (2) натрия, калия, магния и алюминия (через 48 ч после начала эксперимента); К — контрольный вариант.

виде сульфатов. При этом он также полностью окислял железо в среде, содержащей 750 мМ алюминия в виде сульфата, а за 96 ч полностью окислил железо также и в присутствии 1000 мМ Al^{3+} . Штамм полностью окислил железо в присутствии концентраций хлоридов натрия и калия, соответствующих концентрациям катионов 250 мМ, а в экспериментах с хлоридами магния и алюминия — при концентрациях, соответствующих 100 мМ Mg^{2+} и Al^{3+} . Численность клеток штамма оставалась высокой, отличаясь от контрольной не более чем на 20–30%, при концентрациях сульфатов, соответствующих 1000 мМ натрия и 500 мМ калия, магния и алюминия. При этом при 750 и 1000 мМ калия и магния численность была в 30–110 раз ниже, чем в контроле, тогда как при 750 мМ Al^{3+} оставалась высокой, примерно 5×10^8 кл./мл, т.е. в 2–2.5 раза ниже, чем в контроле, а при 1000 мМ ионов алюминия рост почти отсутствовал на протяжении 48 ч эксперимента, но численность становилась достаточно высокой после 96 ч культивирования и полного окисления железа. Штамм достаточно активно рос при 250 мМ калия и натрия, но только при 100 мМ магния и алюминия, внесенных в форме хлоридов.

A. cupricumulans ВН2^Т (рис. 5) за 48 ч практически полностью окислил железо в средах, содержащих 1000 мМ калия и магния в виде сульфатов. При этом он также полностью окислял железо в среде, содержащей 500 и 750 мМ натрия и алюминия в виде сульфата за 48 и 96 ч соответственно. В этих случаях в средах с 1000 мМ натрия и алюминия было окислено от 20 до 35% двухвалентного железа. Штамм полностью окислил железо в присутствии концентраций хлоридов натрия и калия, соответствующих концентрациям катионов 250 мМ, а в экспериментах с хлоридами магния и алюминия — при концентрациях, соответствующих 100 мМ Mg^{2+} и Al^{3+} . Штамм достигал достаточно высокой численности в экспериментах с сульфатами: в случае сульфатов натрия и алюминия численность оставалась высокой до концентрации катионов 500 мМ (примерно 30–50% от контроля); в случае сульфата калия численность была даже несколько выше, чем в контроле при 750 мМ K^+ . При 1000 мМ калия рост значительно угнетался, но численность клеток достигала около 1.4×10^7 кл./мл. Численность клеток была высокой при 1000 мМ ионов магния, но при 100 мМ Mg^{2+} была на 30–40% выше, чем в контроле. Прирост численности оставался значительным при концентрациях хлоридов, соответствующих 250 мМ натрия, калия и магния и 100 мМ алюминия.

A. aeolicum V^Т за 48 ч окислил железо в контрольном варианте только на 85% и за 96 ч на 100%. Поэтому более детально были проанализированы результаты анализа проб, отобранных в конце экспериментов (рис. 6). Было установлено, что за 96 ч штамм окислял железо в средах содержащих 750 мМ калия и магния в виде сульфата. При этом при концентрации калия в 1000 мМ штамм окислил примерно 50% железа. Штамм также полностью окислил железо в присутствии 500 мМ натрия и алюминия, при 750 и 1000 мМ алюминия окисление было незначительным (около 30%), а при 750 мМ натрия было окислено около 50% железа. Штамм *A. aeolicum* V^Т отличался несколько большей устойчивостью к хлориду, что вероятно, может быть связано с условиями в месте его обитания (Golyshina et al., 2009). В экспериментах с натрием, калием, магнием он полностью окислил железо при концентрации солей, соответствующей 500 мМ данных катионов. При этом в эксперименте с хлоридом алюминия железо полностью окислилось только в варианте с 50 мМ Al^{3+} . Штамм был способен достаточно активно расти в присутствии хлоридов металлов в концентрации, соответствовавшей 500 мМ натрия, калия и магния, а также 100 мМ алюминия.

Таким образом, можно прийти к заключению, что изучаемые катионы различались по своему ингибирующему воздействию на исследованные штаммы, но незначительно, а в высоких концентрациях все исследуемые соли ингибировали рост микроорганизмов и окисление железа. Полученные результаты не позволяют говорить о том, что какой-либо из исследуемых катионов обладает наиболее выраженным ингибирующим действием на все исследованные штаммы. Выявленные различия между способностями исследованных катионов ингибировать рост микроорганизмов объясняются различиями в их биологических функциях. Катионы натрия и калия играют важную роль в поддержании мембранного потенциала и водного баланса клетки. Кроме того, эти ионы задействованы в регуляции внутриклеточного рН, что особенно важно для ацидофильных микроорганизмов, которые выкачивают избыточные протоны из цитоплазмы, используя Na^+/H^+ и K^+/H^+ антипорты (Bakker, 1990; Epstein, 2003; Ullrich et al., 2016). Предполагается, что отсутствие таких антипортов у железоокисляющих ацидофилов рода “*Ferrovum*” не позволяет им расти при значениях рН ниже 2, при которых способны развиваться большинство ацидофилов, окисляющих сульфидные минералы (Johnson et al., 2014; Ullrich et al., 2016).

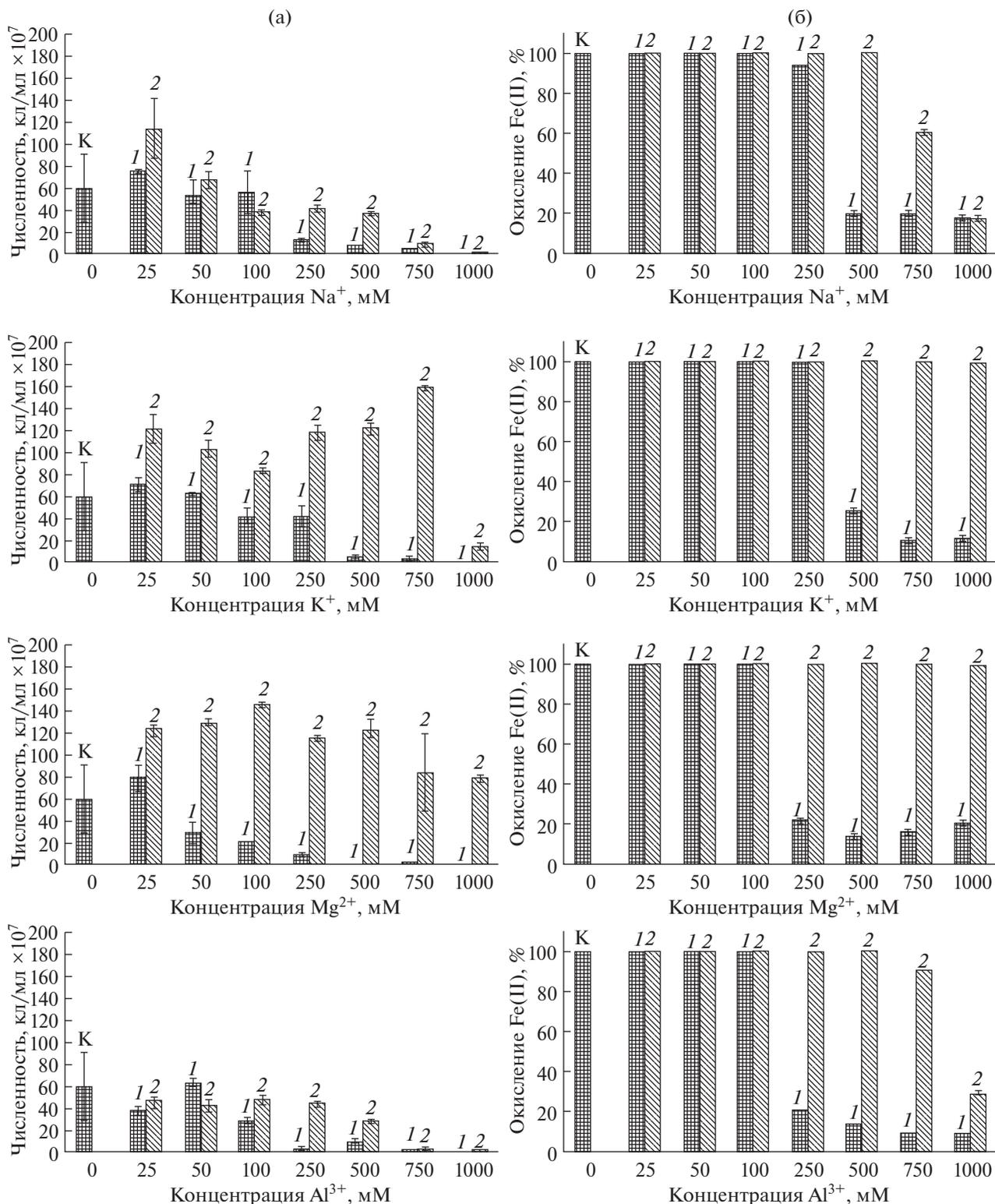


Рис. 5. Численность клеток штамма (а) *A. supricumulans* BH2T и окисление железа (б) в присутствии сульфатов (1) и хлоридов (2) натрия, калия, магния и алюминия (через 48 ч после начала эксперимента), К – контрольный вариант.

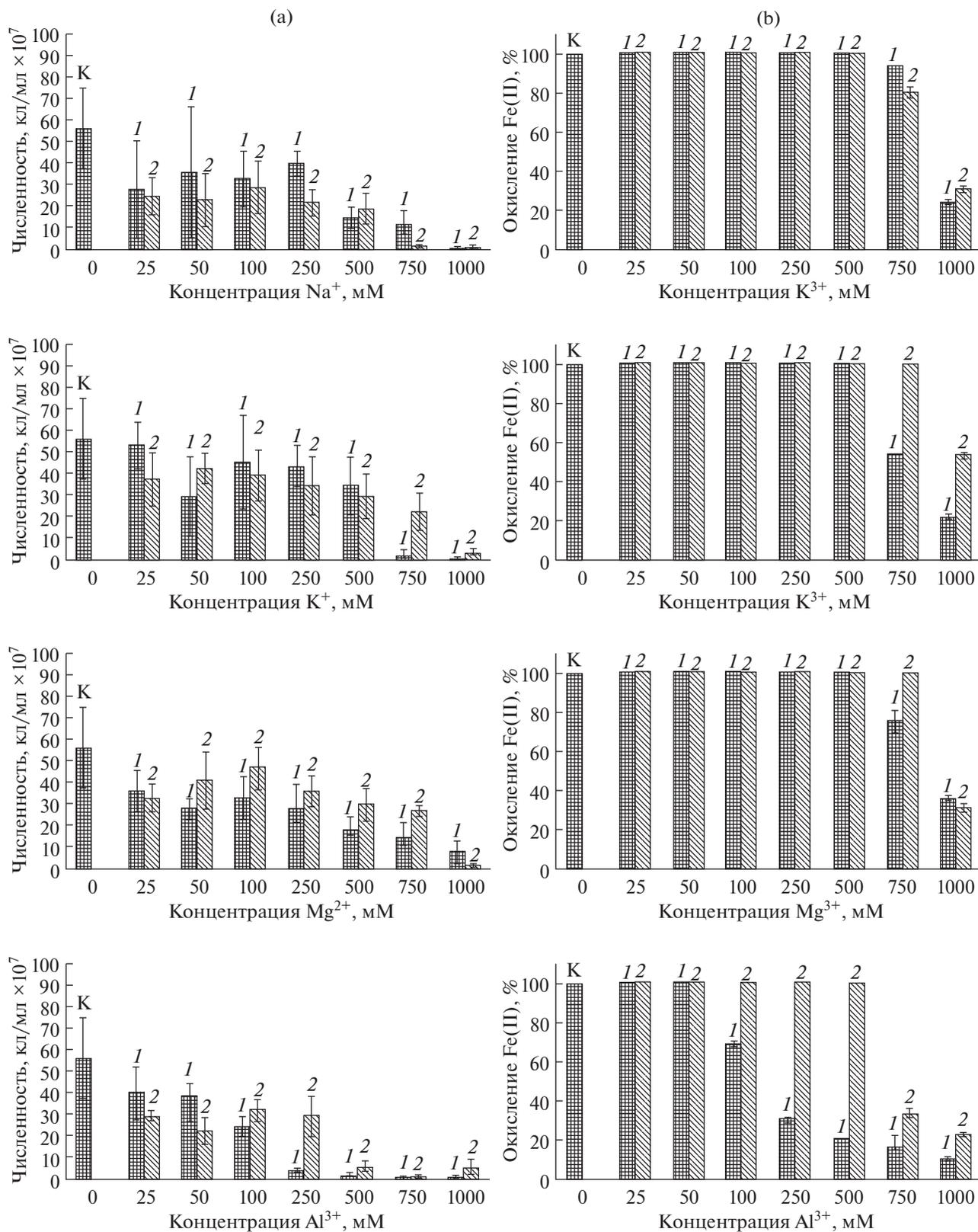


Рис. 6. Численность клеток штамма (а) *A. aeolicum* V^T и окисление железа (б) в присутствии сульфатов (1) и хлоридов (2) натрия, калия, магния и алюминия (через 48 ч после начала эксперимента); К – контрольный вариант.

Самый распространенный двухвалентный катион в клетках живых организмов, Mg^{2+} , участвует в разнообразных метаболических процессах, как стабилизатор различных макромолекул и кофактор ферментов. Кроме того, катионы магния играют ключевую роль в биоэнергетике всех живых организмов, так как взаимодействовать с клеточными ферментами может только форма АТФ, в которой α - и β -фосфатные группы координационно связаны с ионом Mg^{2+} (Groisman et al., 2013). Ионы калия, натрия и магния не обладают специфическим токсическим действием и подавляют рост микроорганизмов в высоких концентрациях, вызывая осмотический стресс.

В отличие от ионов K^+ , Na^+ и Mg^{2+} катионы Al^{3+} не обладают биологической функциональностью, при этом являясь токсичными для живых организмов. Во-первых, ионы алюминия связываются с гидрофильными группами мембранных липидов, нарушая липид-липидные и липид-белковые взаимодействия в мембранах, изменяя, в том числе, и активность транспортных систем. Во-вторых, ионы алюминия способны замещать катионы Mg^{2+} в различных биомолекулах, нарушая их функциональность. Например, ионы алюминия связываются с АТФ в 107 раз прочнее, чем ионы магния, поэтому даже достаточно низкие концентрации Al^{3+} способны ингибировать рост микроорганизмов (Pina, Cervantes, 1996). Однако полученные в настоящей работе данные не выявили наибольшего ингибирующего действия алюминия на исследуемые штаммы по сравнению с другими катионами, особенно в экспериментах с сульфатами.

Нужно также отметить, что исследованные штаммы р. *Acidiplasma* превосходили штаммы р. *Sulfobacillus* по устойчивости к исследуемым катионам. Из анионов хлорид ион оказывал наиболее значительное ингибирующее воздействие на исследуемые штаммы, что, очевидно, было следствием их приспособления к условиям мест обитания, характеризующихся высокими концентрациями металлов и сульфатов, но не хлоридов. Таким образом, полученные в данной работе результаты несколько отличаются от данных, представленных в статье (Wang et al., 2012), где было показано, что морской штамм *Sulfobacillus* sp. ТРУ значительно превосходил штамм р. *Acidiplasma* по устойчивости к $NaCl$ (340 и 60 мМ соответственно). Штамм *Sulfobacillus* sp. ТРУ по устойчивости к хлориду натрия несколько превосходил штаммы *Sulfobacillus*, исследованные в данной работе, тогда как изучаемые нами штаммы *Acidiplasma* превосходили штамм L1.

Рядом работ уже было показано, что хлорид-ион оказывает наиболее выраженное ингибирующее действие на ацидофильные микроорганизмы. Согласно сведениям, представленным в монографии (Zammit, Watkin, 2016), которая обобщает данные большого числа работ в области микробиологии ацидофилов, хлорид-ион, относительно легко проникая через клеточные мембраны ацидофилов, обуславливает снижение положительного потенциала на внутренней стороне мембраны, что для ацидофилов является одним из важнейших механизмов предотвращения избыточного накопления протонов в цитоплазме и поддержания в ней нейтральных значений рН. Высокие концентрации хлорид-ионов способны нарушать клеточный рН гомеостаз у ацидофилов, приводя, таким образом, к закислению цитоплазмы и облегчая проникновение в клетку катионов металлов (Zammit, Watkin, 2016). Этим можно объяснить полученные в настоящей работе результаты, которые продемонстрировали более значительный ингибирующий эффект хлоридов металлов по сравнению с сульфатами.

Использование ацидофилами тех или иных систем их защиты от осмотического стресса в настоящей работе не изучалось, что является темой отдельного исследования. Несмотря на это, имеющиеся в литературе данные могут быть использованы для объяснения полученных в работе результатов. Достаточно большим количеством работ показано, что ацидофилы используют для предупреждения осмотического стресса такие осмопротекторы как трегалоза, таурин, глицин-бетаин, эктоин, гидроксизектоин, пролин (Zammit, Watkin, 2016). Кроме того, предполагается, что для адаптации к среде с высокой ионной силой ацидофилы могут задействовать различные транспортные системы (Zammit, Watkin, 2016). Функционирование упомянутых систем защиты микроорганизмов от осмотического стресса требует, как для биосинтеза осмопротекторов, так и для работы транспортных белков, дополнительных затрат энергии. Это может быть причиной менее выраженного ингибирующего влияния исследуемых ионов на железоокисляющую активность по сравнению с влиянием этих ионов на рост микроорганизмов. Так как окисление железа является для исследуемых штаммов источником энергии и синтеза АТФ, возрастание удельной железоокисляющей активности может рассматриваться как реакция на стрессовые условия.

В заключение отметим, что накопление ионов калия, натрия, магния, алюминия, которые входят в состав нерудных минералов сульфидных руд (в частности, слюды и других алюмосиликатов), в

продуктивных растворах биовыщелачивания является достаточно хорошо известным феноменом. Кроме того, многие биогидрометаллургические производства сталкиваются с необходимостью использовать воды, содержащие высокие концентрации хлорида, вплоть до морской воды. Поэтому сведения о пределах устойчивости микроорганизмов, осуществляющих технологические процессы, к различным катионам и анионам необходимы для разработки эффективных биотехнологических процессов. Полученные результаты могут показывать необходимость углубленных исследований как различных видов минерального сырья, подвергнутого биоокислению, так и осуществляющих эти процессы групп микроорганизмов, так как сведения об их устойчивости к всегда присутствующим в рудах ионам легких металлов и хлориду носят фактически обрывочный характер. Исследования в данном направлении могут открыть достаточно широкие перспективы для дальнейшего развития биогидрометаллургических технологий. Так как различные типы сульфидных руд и концентратов активно выщелачиваются в различных условиях (соленость, температура, pH), данные о влиянии компонентов продуктивных растворов биовыщелачивания на активность различных ацидофильных микроорганизмов могут позволить разработать подходы для регуляции технологических параметров процессов с учетом особенной конкретного минерального сырья.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60053 мол_а_дк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кондратьева Т.Ф., Булаев А.Г., Муравьев М.И. Микроорганизмы в биогидрометаллургии переработки сульфидных руд. М.: Наука, 2015. 212 с.
- Kondrat'eva T.F., Bulaev A.G., Muravyov M.I. Microorganisms in biotechnologies of sulfide ores processing. Moscow: Nauka, 2015. 212 p.
- Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 140 с.
- Reznikov A.A., Mulikovskaya E.P., Sokolov I.Yu. Metody analiza prirodnykh vod (Methods for Analysis of Natural Waters), Moscow: Nedra, 1970. 140 p.
- Bakker E.P. The role of alkali-cation transport in energy coupling of neutrophilic and acidophilic bacteria: An assessment of methods and concepts // FEMS Microbiol. Lett. 1990. V. 75. P. 319–334.
- Bevilaqua D., Lahti H., Suegama P.H., Garcia O., Benedetti A.V., Puhakka J.A., Tuovinen O.H. Effect of Na-chloride on the bioleaching of a chalcopyrite concentrate in shake flasks and stirred tank bioreactors // Hydrometallurgy. 2013. V. 138. P. 1–13.
- Bhatti T.M., Vuorinen A., Tuovinen O.H. Dissolution of non-sulfide phases during the chemical and bacterial leaching of a sulfidic black schist // Hydrometallurgy. 2012. V. 117–118. P. 32–35.
- Bond P.L., Druschel G.K., Banfield J.F. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 4962–4971.
- Bobadilla-Fazzini R.A., Cortes M.P., Maaas A., Parada P. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* strain Cutipay enhances chalcopyrite bioleaching under moderate thermophilic conditions in the presence of chloride ion // AMB Express 2014. V. 4. P. 84.
- Cardenas J.-P., Ortiz R., Norris P.R., Watkin E., Holmes D.S. Reclassification of 'Thiobacillus prosperus' (Huber and Stetter 1989) as *Acidihalobacter prosperus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Ectothiorhodospiraceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 65. P. 3641–3644.
- Davis-Belmar C.S., Cautivo D., Rautenbach G., Demergasso C.S. Biologically assisted copper secondary sulfide ore leaching in the presence of chloride // Adv. Mater. Res. 2013. V. 825. P. 292–295.
- Davis-Belmar C.S., Nicolle J.L.C., Norris P.R. Ferrous iron oxidation and leaching of copper ore with halotolerant bacteria in ore columns // Hydrometallurgy. 2008. V. 94. Is. 1–4. P. 144–147.
- Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P.R., Bond P.L. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms // Microbiology (SGM). 2003. V. 149. P. 1959–1970.
- Dopson M., Holmes D.S. Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 8133–8144.
- Dopson M., Holmes D.S., Lazcano M., McCredden T.J., Bryan C.G., Mulroney K.T., Steuart R., Jackaman C., Watkin E.L. Multiple osmotic stress responses in *Acidihalobacter prosperus* result in tolerance to chloride ions // Front. Microbiol. 2017. V. 7. Article 2132.
- Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria // Prog. Nucl. Acid Res Mol. Biol. V. 75. / Ed. Moldave K. Oxford: Academic Press, 2003. P. 293–320.
- Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrat'eva T.F., Moore E.R., Abraham W.R., Lünsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 997–1006.
- Golyshina O.V., Timmis K.N. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 1277–1288.
- Golyshina O.V., Yakimov M.M., Lünsdorf H., Ferrer M., Nimtz M., Timmis K.N., Wray V., Tindall B.J., Golyshin P.N. *Acidiplasma aeolicum* gen. nov., sp. nov., a euryarchaeon of the family *Ferroplasmaceae* isolated from a hydrothermal pool, and transfer of *Ferroplasma cupricumulans* to

- Acidiplasma cupricumulans* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2815–2824.
- Groisman E.A., Hollands K., Kriner M.A., Lee E.J., Park S.Y., Pontes M.H. Bacterial Mg²⁺ homeostasis, transport, and virulence // Annu. Rev. Genet. 2013. V. 47. P. 625–646.
- Hallberg K.B., Hedrich S., Johnson D.B. *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family *Ectothiorhodospiraceae* // Extremophiles. 2011. V. 15. P. 271–279.
- Hawkes R.B., Franzmann P.D., O'Hara G., Plumb J.J. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaea isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap // Extremophiles. 2006. V. 10. P. 525–530.
- Huber H., Stetter K.O. *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field // Arch. Microbiol. V. 151. P. 479–485.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., Hedrich S. Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium “*Ferroplasma myxofaciens*” // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 672–680.
- Keeling S.E., Davies K.L., Palmer M.-L., Townsend D.E., Watkin E., Johnson J.A., Watling H.R. Utilization of native microbes from a spent chalcocite test heap // Hydrometallurgy. 2006. V. 83. P. 124–131.
- Korehi H., Blöthe M., Sitnikova M.A., Dold B., Schippers A. Metal mobilization by iron- and sulfur-oxidizing bacteria in a multiple extreme mine tailings in the Atacama Desert, Chile // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 2189–2196.
- Muravyov M.I., Bulaev A.G. Two-step oxidation of a refractory gold-bearing sulfidic concentrate and the effect of organic nutrients on its biooxidation // Min. Eng. 2013. V. 45. P. 108–114.
- Pina R.G., Cervantes C. Microbial interactions with aluminum // Biometals. 1996 V. 9. P. 311–316.
- Pakostova E., Grail B.M., Johnson D.B. Column bioleaching of a saline, calcareous copper sulfide ore // Solid State Phenom. 2017. V. 262. P. 7–11.
- Rea S.M., McSweeney N.J., Degens B.P., Morrisa C., Siebert H.M., Kaksonen A.H. Salt-tolerant microorganisms potentially useful for bioleaching operations where fresh water is scarce // Miner. Engin. 2015. V. 75. P. 126–132.
- Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification // Microbial Processing of Metal Sulfides / Eds. Donati E.R., Sand W. N.Y.: Springer, 2007. P. 3–33.
- Simmons S., Norris P.R. Acidophiles of saline water at thermal vents of Vulcano, Italy // Extremophiles. 2002. V. 6. P. 201–207.
- Suzuki I., Lee D., Mackay B., Harahuc L., Oh J.K. Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 5163–5168.
- van Hille R.P., van Wyk N., Froneman T., Harrison S.T.L. Dynamic evolution of the microbial community in BIOX leaching tanks // Adv. Mater. Res. 2013. V. 825. P. 331–334.
- Wang Y., Su L., Zhang L., Zeng W., Wu J., Wan L., Qiu G., Chen X.Z.H. Bioleaching of chalcopyrite by defined mixed moderately thermophilic consortium including a marine acidophilic halotolerant bacterium // Bioresour. Technol. 2012. V. 121. P. 348–354.
- Watling H.R., Watkin E.J.L., Ralph D.E. The resilience and versatility of acidophiles that contribute to the bio-assisted extraction of metals from mineral sulfides // Environ. Technol. 2010. V. 31. P. 915–933.
- Watling H.R. Chalcopyrite hydrometallurgy at atmospheric pressure: Review of acidic chloride process options // Hydrometallurgy. 2014. V. 146. P. 96–110.
- Zammit C.M., Mangold S., Jonna V., Mutch L.A., Watling H.R., Dopson M., Watkin E.L. Bioleaching in brackish waters – effect of chloride ions on the acidophile population and proteomes of model species // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93. P. 319–329.
- Zammit C.M., Watkin E.L.J. Adaptation to extreme acidity and osmotic stress // Acidophiles. Life in Extremely Acidic Environments / Eds. Quatrini R., Johnson D.B. Norfolk: Caister Academic Press, 2016. P. 49–62.
- Zhou H., Zhang R., Hu P., Zeng W., Xie Y., Wu C., Qiu G. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 105. P. 591–601.

Effect of Light Metal Ions and Chloride on Activity of Moderately Thermophilic Acidophilic Iron-Oxidizing Microorganisms

A. G. Bulaev^{1,2,*} and A. N. Chernyshov²

¹Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Received January 18, 2018

Abstract—The effect of sodium, potassium, magnesium, and aluminum ions, as well as of the chloride ion on the growth and ferrous iron oxidation by moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing microorganisms was studied. Strains of the microorganisms predominant in biohydrometallurgical processes (bacteria of ge-

nus *Sulfobacillus* and archaea of the genus *Acidiplasma*) were the subjects of the study. Ability of the studied strains to grow and oxidize ferrous iron in the media containing different concentrations of sodium, potassium, magnesium, and aluminum (up to 1000 mM) was determined. The experiments were conducted in two variants, in which the studied metals were added to the medium as sulfates and chlorides, respectively. It was revealed that inhibitory effects of the studied metals on the studied strains differed insignificantly and that high concentrations all studied salts inhibited growth and ferrous iron oxidation. The studied *Acidiplasma* strains were shown to be more tolerant to the cations than the *Sulfobacillus* strains. The inhibitory effect of chloride ion on the studied strains was the most significant, which were probably adapted to the habitats characterized by high concentrations of metals and sulfates, but not of chloride ions. The mechanisms of action of the studied light metal ions on growth of iron-oxidizing acidophilic microorganisms are discussed.

Keywords: biohydrometallurgy, acidophilic microorganisms, *Acidiplasma*, *Sulfobacillus*, metal ions, chloride ion

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* Z78

© 2018 г. Н. С. Величко^{а, *}, А. К. Суркина^а, Ю. П. Федоненко^{а, b},
Э. Л. Здоровенко^с, С. А. Коннова^{а, b}

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия
^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

^сИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: velichko_n@ibppm.ru

Поступила в редакцию 12.02.2018 г.

Из внешней мембраны клеток азотфиксирующих эндофитных ризобактерий типового штамма *Herbaspirillum seropedicae* Z78 фенольной экстракцией выделен липополисахарид. В составе липида А выделенного липополисахарида выявлены 3-гидроксидекакановая, 3-гидроксидодекакановая, додекановая, тетрадекановая и гексадекановая кислоты. Установлено, что 3-гидроксидодекановая кислота присоединена к глюкозаминбиозному остову липида А амидной связью. Впервые для хербаспирилл установлена структура О-специфического полисахарида *H. seropedicae* Z78, характеризующаяся гетерогенностью и присутствием редкого для грамотрицательных бактерий компонента — глицерола. Показано, что О-специфический полисахарид *H. seropedicae* Z78 состоит из двух типов повторяющихся звеньев, одно из которых представлено глицерол-1-фосфатом, а второе — глицерол-1-фосфатом основной цепи, замещенным во втором положении N-ацетил-D-глюкозаминином. Установлено, что липополисахарид *H. seropedicae* Z78 обладает низкой токсичностью в отношении теплокровных животных, умеренно дозозависимо индуцирует синтез интерлейкинов клетками цельной крови человека, а также синтез NO спленоцитами мышей, что может свидетельствовать о перспективности липополисахарида как антагониста классических эндотоксинов.

Ключевые слова: *Herbaspirillum seropedicae*, липополисахарид, О-специфический полисахарид, структура

DOI: 10.1134/S002636561805018X

Грамотрицательные ризобактерии рода *Herbaspirillum* относятся к β -субклассу протеобактерий. Представители практически всех видов этого рода, за исключением некоторых фитопатогенных штаммов *H. rubrisubalbicans*, способны стимулировать рост и развитие растений (Pedraza, 2008). *H. seropedicae* вступают в эндосимбиоз с широким кругом растений, в том числе с такими важными хлебными и кормовыми злаками как рис, кукуруза, пшеница, сорго и сахарный тростник (Baldani et al., 1992; Reinhold-Hurek, Hurek, 1998). Анализ геномных различий между фитопатогенным штаммом *H. rubrisubalbicans* M1 и эндосимбионтом *H. seropedicae* SmR1 показал, что липополисахариды (ЛПС) и адгезины являются потенциальными молекулярными факторами, обуславливающими фенотипические различия (Monteiro et al., 2012). Гликополимеры поверхности бактериальных клеток хербаспирилл, экзополисахариды и ЛПС внешней мембраны, вовлечены в процесс колонизации корней растений-хозяев (Balsanel-

li et al., 2013; Serrato, 2014). Структурные исследования этих биополимеров могут внести существенный вклад в понимание молекулярных механизмов формирования и функционирования растительно-микробных взаимодействий.

ЛПС (О-антиген) — основной и обязательный компонент внешней мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий, состоит из трех структурно различающихся частей: липида А, корового олигосахарида и О-специфического полисахарида (ОПС). Из семи штаммов *Herbaspirillum* spp. фенольной экстракцией были выделены ЛПС, для которых был охарактеризован химический состав и электрофоретические профили (Serrato et al., 2010). Высказано предположение, что выявленные штаммовые различия в составе ЛПС отражают характер отношений этих бактерий с растениями-хозяевами, включая способность инфицировать различные ткани побегов или корней. Из ЛПС *H. seropedicae* SmR1 и двух мутантных штаммов, дефектных по биосинтезу рамнозы

(*rmlB*⁻ и *rmlC*⁻) мягким кислотным гидролизом были выделены липиды А, охарактеризованы их моносахаридный и жирнокислотный состав, а методом спектроскопии MALDI-TOF установлена структура углеводного остова липида А (Serrato et al., 2012). Сведения о структуре ОПС хербаспирилл в литературе отсутствуют.

Следует отметить, что ЛПС непатогенных почвенных бактерий обладают выраженной биологической активностью не только в отношении растений, но и организма человека, что определяется сходством механизмов реализации ранних этапов взаимодействия при формировании как ассоциации, так и патогенеза (Berg et al., 2005). Отсутствие высокой токсичности и пирогенности позволяет рассматривать их в качестве перспективных антагонистов эндотоксинов патогенных бактерий, способных купировать септический шок (Schletter et al., 1995; Komaniecka et al., 2010).

Целью данной работы было исследование особенностей строения ЛПС *H. seropedicae* Z78, их токсичности и активности в индуцировании продукции интерлейкинов и микробицидного фактора NO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия культивирования бактерий. Объектом исследования был штамм *Herbaspirillum seropedicae* Z78 (IBPRM217), предоставленный Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibprm.ru>). Бактерию выращивали в жидкой синтетической питательной среде с витаминами (Смолякина и соавт., 2012) при 30°C в течение 24 ч, что соответствовало окончанию экспоненциальной фазы роста.

Выделение, очистка и деградация ЛПС. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 40 мин. Для удаления с поверхности клеток капсульных полисахаридов клетки трижды ресуспендировали в 0.15 М NaCl, механически перемешивали и переосаждали. После обезжиривания петролейным эфиром клетки высушивали ацетоном и мелко диспергировали. Экстракцию ЛПС из ацетонового порошка (10 г) проводили горячим 45% водным фенолом по модифицированной методике Вестфаль (Кульшин и соавт., 1987). ЛПС очищали двукратным ультрацентрифугированием (105 000 g, 4 ч). Препараты ЛПС лиофилизировали с использованием Benchtop 2K (“Virtis”, США).

Деградацию ЛПС (110 мг) проводили 2% CH₃CO₂H (4 мл) при 100°C до выпадения осадка липида А (9.5 мг), который отделяли центрифугированием (13 000 g, 20 мин). Водорастворимую часть гидролизата фракционировали методом гель-фильтрации на колонке (56 × 2.6 см) с Sephadex G-50 (“GE Healthcare”, США) в 0.05 М пиридин-ацетатном буфере (pH 4.5). Детекцию продук-

тов разделения в элюатах проводили с помощью дифференциального проточного рефрактометра (“Knauer”, Германия). Выход высокомолекулярной фракции составил 6.1% от массы ЛПС. Дефосфорилирование ОПС проводили при 4°C в течение 48 ч обработкой 48% HF, после удаления которой модифицированный препарат хроматографически разделяли гель-фильтрацией на колонке с TSK HW-40 (“Toyo Soda”, Япония).

Электрофорез ЛПС проводили в 15% ДСН-ПААГ (Hitchcock, Brown, 1983) в течение 1.5 ч при силе тока 0.03 А. Визуализацию гликанов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра после периодатного окисления (Tsai, Frasch, 1982).

Эндотоксическая активность ЛПС. Острую токсичность ЛПС определяли экспресс-методом на белых нелинейных мышах, предварительно sensibilizированных 3.2% D-галактозамингидрохлоридом путем однократного внутрибрюшинного введения гликополимеров. Наблюдение за животными проводили на протяжении 48 ч (Прозоровский и соавт. 1978).

Спленциты выделяли из селезенки самцов нелинейных лабораторных белых мышей в возрасте 2–2.5 мес. весом 18–20 г. После подсчета выделенных клеток в камере Горяева определяли их жизнеспособность методом эксклюзии трипанового синего. Затем в лунки планшета для иммунологических реакций вносили 180 мкл взвеси спленцитов (10⁷ кл./мл) и 20 мкл раствора ЛПС (0.1, 1.0 или 10.0 мкг/мл). Инкубацию осуществляли 48 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Интенсивность продукции NO спленцитами определяли методом Грисса по накоплению в инкубационной среде ионов NO₂⁻ (Green et al., 1982).

Аликвоты венозной крови условно-здоровых доноров-добровольцев по 0.5 мл разводили равным объемом среды 199, содержащей исследуемые препараты ЛПС в конечной концентрации 0.1 мкг/мл, и инкубировали 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Содержание цитокинов, фактора некроза опухоли (ФНО-α) и интерлейкин-1β (ИЛ-1β) в супернатантах определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем на основе моноклональных антител (“Вектор-Бест”, Россия).

Аналитические методы. Колориметрическое определение содержания в препаратах ЛПС углеводов, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), белков, нуклеиновых кислот (НК), фосфора проводили общепринятыми методами, описанными в работе (Konnova et al., 1994). Измерения выполняли на спектрофотометре Specord 40 (“Analytik Jena AG”, Германия).

Анализ жирных кислот, входящих в состав липида А ЛПС, проводили методом ГЖХ на хрома-

тографе GC-2010 (“Shimadzu”, Япония) с капиллярной колонкой EQUITY-1 (30 м × 0.32 мм) (“Supelco”, США). Программирование температуры осуществляли в интервале от 130 до 250°C со скоростью 4°C/мин, температура испарителя 250°C, температура детектора 260°C, скорость газа-носителя (He) 1.3 см³/мин; сброс 1 : 50. Метилирование проводили по методу, описанному в работе (Mayer et al., 1985).

Моносахаридный состав полисахаридной части ЛПС после гидролиза 2 М CF₃CO₂H (120°C, 2 ч), последующего восстановления и ацетилирования (Sawardeker et al., 1965) определяли методом ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard 5890 с капиллярной колонкой HP-5 (“Agilent”, США) в градиенте температур от 160 (1 мин) до 290°C со скоростью нагрева 7°C/мин. Для определения абсолютной конфигурации глюкозамина (GlcN) ПС гидролизали 2 М CF₃CO₂H (120°C, 2 ч), а затем *N*-ацетилировали (400 мкл NaHCO₃, 60 мкл As₂O, 0°C, 1 ч), инкубировали с (*S*)-2-октанолом (100 мкл) в присутствии CF₃CO₂H (15 мкл) (120°C, 16 ч), ацетилировали и анализировали методом ГЖХ, как описано выше.

Перед метилированием ПС (1.2 мг) обрабатывали амберлитом IR-120 (H⁺) для удаления катионов и лиофилизировали. Метилирование проводили обработкой CH₃I в диметилсульфоксиде в присутствии метилсульфинилметанида натрия (Conrad, 1972). Модифицированный ПС очищали с применением картриджа Sep-Pak (“Waters”, США) и разделяли на две части, одну из которых восстанавливали LiBH₄ в 70% 2-пропанол (20°C, 2 ч). Частично метилированные ацетаты полиолов получали гидролизом метилированного ПС в 10 М HCl (80°C, 30 мин) с последующим восстановлением NaBH₄ и ацетилированием смесью пиридин–As₂O (1 : 1, 100°C, 1 ч) и анализировали методом ГЖХ-МС на приборе Finnigan Trace DSQ (“Thermo Finnigan”, США) с колонкой TR-5MS (25 м × 0.15 мм) в градиенте температур от 160 (5 мин) до 250°C со скоростью нагрева 2°C/мин. Интерпретацию масс-спектров проводили по базам данных.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре AvanceII-600 (“Bruker”, Германия) в растворе 99.96% D₂O при 30°C (внутренние стандарты 3-триметилсилилпропаноат-*d*₄, δ_H 0.0 м.д., и ацетон, δ_C 31.45 м.д.). Образцы предварительно дважды лиофилизировали из D₂O. Двумерные спектры снимали, используя стандартное математическое обеспечение компании “Bruker”. Для сбора и обработки данных использовали программу Bruker TopSpin 2.1. Время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 200 мс. gHMBC-спектры были записаны с 60-мс задержкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что капсульные полисахариды исследуемых бактерий *H. seropedicae* Z78 являются экстраклеточной формой ЛПС (Смолякина и соавт., 2012), поэтому удаление капсулы с поверхности клеток являлось принципиально необходимым для предотвращения смешения гликополимеров поверхности. Использование модифицированного метода фенольной экстракции ЛПС с последующим двукратным ультрацентрифугированием позволило получить очищенный препарат ЛПС, выход которого составил ~ 6% от веса сухих клеток.

Электрофорез в Ds-Na-ПААГ выявил присутствие в ЛПС как S-, так и R-форм молекул с преобладанием в препарате последних, что согласуется с представленными ранее данными в работе (Serrato et al., 2010). Анализ состава ЛПС *H. seropedicae* Z78 выявил присутствие углеводной (~20%), включающей КДО (~2%) – маркерного компонента ЛПС, и липидной составляющих. В липиде А исследуемого ЛПС методом ГЖХ после метанолиза были обнаружены предельные, непредельные алкановые и гидроксилкановые кислоты с длиной цепи от C₁₀ до C₁₆. Основными по содержанию были 3-гидроксидекановая (~26% от всех МЭЖК) и тетрадекановая (~28%) кислоты, а также были обнаружены в примерно равном соотношении 3-гидроксидекановая, додекановая и гексадекановая кислоты. Анализ состава жирных кислот ЛПС после O-деацелирования показал увеличение содержания 3-гидроксидекаановой кислоты, что свидетельствовало о ее присоединении к глюкозаминбиозному остову липида А амидной связью. Данные о составе жирных кислот липидной части ЛПС *H. seropedicae* Z78 коррелировали с таковыми для ранее установленной предполагаемой структуры липида А *H. seropedicae* SMR1 (Serrato et al., 2012). Показано, что в основе липида А *H. seropedicae* SMR1 находятся два β-1,6-связанных остатка d-GlcN, которые фосфорилированы в положении 1 остатка GlcNI и положении 4' остатка GlcNII, а к остаткам фосфорной кислоты присоединены остатки 4-амино-4-дезоксарабинозы (Ara4N). Обе аминогруппы глюкозаминбиозы в положениях 2' и 2 ацилированы остатками (R)-3-гидроксидекаановой кислоты (Serrato et al., 2012).

Для выделения отдельных структурных компонентов молекулы ЛПС была проведена мягкая кислотная деградация. Выпавший осадок липида А отделяли центрифугированием, а водорастворимые компоненты углеводной природы разделяли на колонке с Sephadex G-50, что позволило получить фракции ОПС и корового олигосахариды.

В составе корового олигосахариды методом ГЖХ ацетатов полиолов было показано наличие нейтральных сахаров – рамнозы (Rha), маннозы

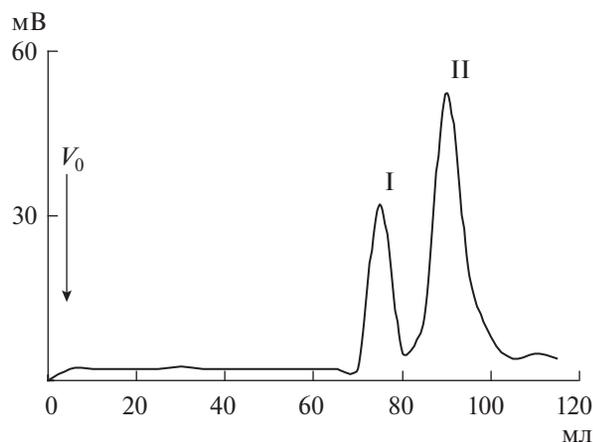


Рис. 1. Профиль элюции продуктов дефосфорилирования ОПС *H. seropedicae* Z78 на колонке с носителем Тоуорpearl TSK HW-40.

(Man), глюкозы (Glc), галактозы (Gal), гептозы (Hep) и аминсахаров – GlcN и галактозамина (GalN), в то время как в составе ОПС было выявлено присутствие только GlcN. ГЖХ-МС анализ частично метилированных ацетатов полиолов показал, что ОПС почти на 80% состоит из замещенного глицерина (Gro). Следует отметить, что остатки полиолов (глицерина, рибитола, маннитола) являются неотъемлемой частью тейхоевых кислот грамположительных бактерий. Однако у ряда грамотрицательных бактерий остатки спиртов выявлены в структуре повторяющихся звеньев полисахаридов в ЛПС, причем они встречаются как в виде боковых заместителей, так и в структу-

ре основной цепи, соединяясь с остатками сахаров через фосфоэфирную связь (Zuch et al., 2001; Перепелов и соавт., 2009).

^{31}P ЯМР спектр исследуемого ОПС показал наличие сигнала одной монофосфатной группы при 1.43 м.д. Хроматографическим разделением на колонке с TSK HW-40 ОПС после дефосфорилирования были получены две низкомолекулярные фракции (рис. 1). После восстановления и ацетилирования с помощью ГЖХ и ГЖХ-МС были идентифицированы в составе первой фракции (ОС I) Gro и GlcNAc, а в составе второй (ОС II) – только Gro, что свидетельствовало о гетерогенности строения повторяющегося звена ОПС исследуемого штамма и фосфорилировании остатка Gro.

Химическая структура повторяющегося звена О-цепи ЛПС *H. seropedicae* Z78 была установлена на основании сравнительного анализа данных ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектроскопии ОС I и ОПС (рис. 2, табл. 1). В ^{13}C ЯМР-спектре фракции ОС I (табл. 1) присутствовали сигналы остатков GlcNAc и Gro, включающие сигнал одного аномерного атома углерода при 98.3 м. д., трех $\text{OCH}_2\text{-C}$ групп (С-6 GlcNAc, С-1 и С-3 Gro) при 61.8–62.8 м. д., трех сигналов вторичных углеродов моносахаридного цикла при 71.4–73.4 м. д. и С-2 глицерола при 80.5 м. д., одного атома углерода, связанного с азотом (С-2 GlcN) при 55.2 м. д. и сигналы N-ацетильной группы при 176.1 и 23.5 м. д. Соответственно, в ^1H ЯМР спектре фракции ОС I (табл. 1) присутствовал сигнал одного аномерного протона при 5.04 м. д., одной N-ацетильной группы при 2.04 м. д., и остальных протонов в области 3.49–3.92 м. д. Полученные данные свиде-

Таблица 1. Данные спектров 500-МГц ^1H ЯМР и 125-МГц ^{13}C ЯМР интактного ОПС и ОС после дефосфорилирования ОПС *H. seropedicae* Z78 (химические сдвиги в м. д.)

Остаток	Ядра	1 (а; б)	2	3 (а; б)	4	5	6 (а; б)	CH_3CO
<i>ОС I после дефосфорилирования ОПС</i>								
$\alpha\text{-d-GlcpNAc}$	^1H	5.04	3.92	3.77	3.49	3.95	3.84; 3.79	2.04
	^{13}C	98.3	55.2	72.3	71.4	73.4	61.9	23.5; 176.1
$\rightarrow 2\text{-Gro}$	^1H	3.67; 3.72	3.75	3.67; 3.72				
	^{13}C	61.8	80.5	62.8				
<i>ОПС I</i>								
$\alpha\text{-d-GlcpNAc}$	^1H	5.10	3.94	3.82	3.48	3.95	3.89;	2.09
	^{13}C	98.1	55.0	72.3	71.3	73.3	3.80; 61.8	23.4; 175.9
$\rightarrow 2,3\text{-Gro-1-P-(O}\rightarrow)$	^1H	3.99; 4.05	4.07	3.99; 4.05				
	^{13}C	65.9	77.3	66.5				
<i>ОПС II</i>								
$\rightarrow 3\text{-Gro-1-P-(O}\rightarrow)$	^1H	3.91; 3.97	4.06	3.91; 3.97				
	^{13}C	67.5	70.9	67.5				

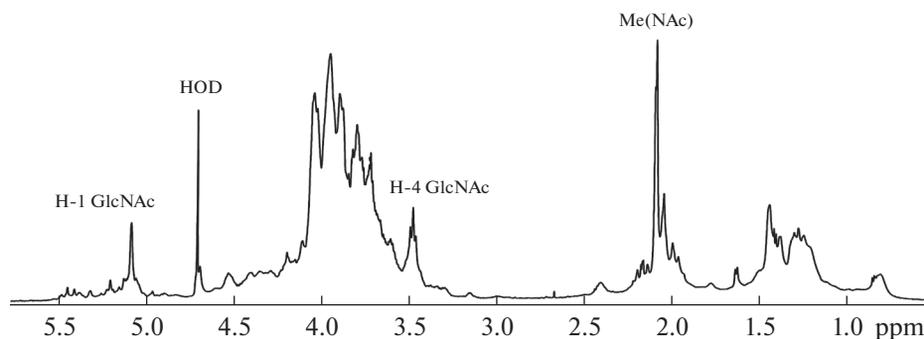


Рис. 2. ^1H ЯМР спектр ОПС *H. seropedicae* Z78.

тельствуют о том, что повторяющееся звено представлено остатками Gro и GlcNAc. Отсутствие сигналов в области 83–88 м. д. в спектре ^{13}C ЯМР, характерных для фуранозидов, свидетельствует о пиранозной форме остатка GlcN (Bock, Pedersen, 1983).

Одномерные ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектры были отнесены с помощью двумерных экспериментов COSY, TOCSY, ROESY и ^1H , ^{13}C HSQC. TOCSY спектр выявил корреляции H-1 с H-2–H-6 для моносахаридного остатка, что подтвердило его глюко конфигурацию. Относительно низкое значение константы спин-спиновой взаимодействия (КССВ) $J_{1,2} \sim 3$ Гц указывало на то, что остаток глюкозамина присоединен α -гликозидной связью. Отнесение сигналов H-1/C-1, H-2/C-2 и H-3/C-3 Gro было выполнено на основании корреляций ^1H , ^{13}C HSQC спектра. Двумерный ROESY эксперимент показал присутствие кросс-пиков между аномерным протоном GlcNAc и протоном при C-2 Gro 5.04/3.75 м.д., в то же время в ^1H , ^{13}C HMBC спектре была выявлена корреляция между H-1/C-2 GlcNAc/Gro и H-2/C-1 Gro/GlcNAc соответственно.

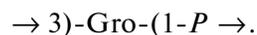
Эксперименты ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, включающие ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY, ^1H , ^{13}C HSQC и HMBC, для исходного образца ОПС позволили отнести все сигналы по аналогии с описанным выше. Характерной особенностью исследуемого препарата было смещение химических сдвигов H-1, H-3 Gro в слабопольную область (табл. 1), обусловленное наличием связи с монофосфатным остатком. Помимо этого в спектрах присутствовали сигналы Gro (ОПС II), не связанного с GlcNAc. Полученные результаты свидетельствуют о том, что изученный ОПС содержит в своем составе два вида повторяющихся звеньев следующего строения:



1

↓

2



(1)

(2)

Остается неясным, входит ли в состав ЛПС два независимых ОПС, или они являются достаточно длинными блоками внутри одной О-цепи.

Как уже отмечалось, подобные структуры являются характерными для тейхоевых кислот грамположительных (Варбанец, 1988; Naumova et al., 2001) и достаточно редко встречаются у представителей грамотрицательных бактерий. Глицерол-1-фосфат был выявлен в составе ОПС *Proteus mirabilis* O40 (Kondakova et al., 2005), а также в близких по структуре повторяющихся звеньях ОПС бактерий *Chronobacter malonicus* G3864 (O1), *E. coli* O29 и *Shigella dysenteriae* тип 11 (Shashkov et al., 2015). Близкое к изученному в данной работе строению ОПС *H. seropedicae* Z78 имеет строение ОПС *Budvicia aquatica* 97U124, повторяющееся звено которого состоит из глицерол-1-фосфата в основной цепи, замещенного во втором положении остатками β -d-Glc (Здоровенко и соавт., 2011).

Наличие в составе ОПС *H. seropedicae* Z78 звена GlcNAc может быть важным фактором, определяющим успех колонизации этими микроорганизмами растений хозяев, как это показано для других штаммов бактерий этого вида (Balsanelli et al., 2013).

Учитывая необычное для грамотрицательных бактерий строение ЛПС штамма *H. seropedicae* Z78, а также ее эндофитность, усиливающую сходство с патогенными микроорганизмами, представляется необходимой характеристика биологических свойств ЛПС. Известно, что за биологическую активность эндотоксина несет ответственность гидрофобный домен молекулы — липид А. Участие ОПС в процессе взаимодействия ЛПС с мембранами клеток-мишеней в настоящий

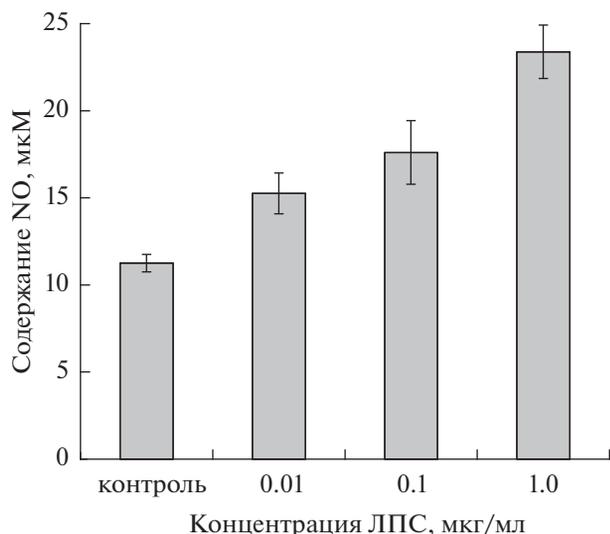


Рис. 3. Продукция NO мышинными спленоцитами под воздействием ЛПС *H. seropedicae* Z78.

момент изучено крайне слабо. Показано, что ОПС, в составе которых присутствуют моносахариды с *глюко-* и *манно-*конфигурацией, характеризующиеся экваториальным расположением гидроксильных групп при 3 и 4 атомах углерода, могут стимулировать активацию системы комплемента по механизму так называемого “лектинового пути” (Zhao et al., 2002).

Проведенные исследования ЛПС *H. seropedicae* Z78 позволили выявить его слабую токсичность в отношении теплокровных животных. Особенностью исследуемого препарата было проявление признаков интоксикации у мышей в виде адинамии через 0.5 ч после введения ЛПС в диапазоне концентраций от 2.5 до 45 мкг/мышь. Однако через 2–3 ч активность животных восстанавливалась до уровня контрольной группы. Средняя летальная доза (LD_{50}) для исследуемого гликополимера составила 48 мкг/мышь, что на два порядка больше по сравнению с действием классического эндотоксина ЛПС *E. coli* O55, у которого LD_{50} составила 0.14 мкг/мышь.

Оксид азота является показателем активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и рассматривается как один из факторов антимикробной защиты макроорганизма (Wu et al., 2003). Клетки некоторых паренхиматозных органов и тканей, к которым относятся и спленоциты, способны экспрессировать iNOS. Добавление ЛПС *H. seropedicae* Z78 в диапазоне концентраций 0.01–1.0 мкг/мл к суспензии спленоцитов мышей приводило к дозозависимому увеличению содержания NO в инкубационной среде (рис. 3). Максимум продукции NO (23.4 ± 1.5 мкМ в лунке) был отмечен при концентрации ЛПС 1 мкг/мл, что в два раза превышало содержа-

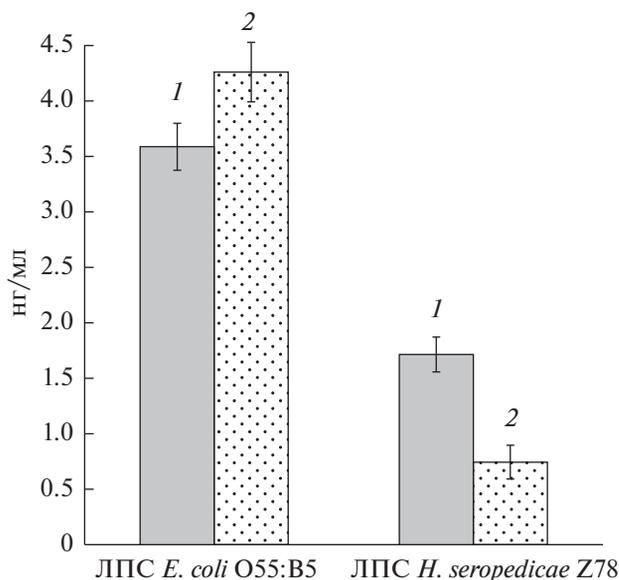


Рис. 4. Влияние ЛПС *E. coli* O55:B5 и ЛПС *H. seropedicae* Z78 на синтез провоспалительных цитокинов ФНО-α (1) и ИЛ-1β (2) клетками цельной крови человека. Значения контрольных образцов (без ЛПС) составили 5 и 4 нг/мл для ФНО-α и ИЛ-1β соответственно.

ние NO в контрольной группе интактных спленоцитов (11.3 ± 0.5 мкМ в лунке).

Была выявлена активность ЛПС *H. seropedicae* Z78 в отношении индукции синтеза провоспалительных цитокинов ФНО-α и ИЛ-1β клетками цельной крови человека (рис. 4). Исследуемый препарат в концентрации 0.1 мкг/мл активировал продукцию ФНО-α в большей степени по сравнению с ИЛ-1β. К 24 часам процесса инкубации содержание цитокинов составило ~0.7 и 1.7 нг/мл для ИЛ-1β и ФНО-α соответственно, что, в то же время, было существенно ниже стимулирующего эффекта ЛПС *E. coli* O55:B5 в отношении синтеза этих же цитокинов – 4.2 и 3.6 нг/мл для ИЛ-1β и ФНО-α соответственно.

Цитокины участвуют в координации защитных реакций, позволяющих успешно бороться с инфекциями и злокачественными новообразованиями. Однако их гиперпродукция, наблюдаемая при чрезмерной активации иммунокомпетентных клеток макроорганизма бактериальными ЛПС, становится фактором, индуцирующим стремительное развитие патологического процесса (Shletter et al., 1995). Отсутствие токсичности ЛПС *H. seropedicae* Z78 в отношении теплокровных животных в сочетании с умеренным стимулирующим воздействием на факторы естественной резистентности макроорганизма, а также структурные особенности данного гликополимера, открывают перспективы исследования его антагонистических свойств в отношении ЛПС патогенных бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варбанец Л.Д. Структура и биологическая роль полисахаридов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* // Микробиол. журнал. 1988. Т. 50. № 5. С. 98–107.
- Здорovenko Э.Л., Варбанец Л.Д., Броварская О.С., Валуева О.А., Шашков А.С., Книрель Ю.А. Липополисахарид *Budvicia aquatica* 97U124: иммунохимические свойства и строение // Микробиология. 2011. Т. 80. № 3. С. 366–371.
- Zdorovenko E.L., Varbanets L.D., Brovarskaya O.S., Valueva O.A., Shashkov A.S., Knirel' Yu.A. Lipopolysaccharide of *Budvicia aquatic* 97U124: immunochemical properties and structure // Microbiology. 2011. V. 80. P. 372–377.
- Кульшин В.А., Яковлев А.П., Аваева С.Н., Дмитриев Б.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1987. № 5. С. 44–46.
- Перепелов А.В., Лю Б., Сенченкова С.Н., Шашков А.С., Фенг Л., Ванг Л., Книрель Ю.А. Гены биосинтеза и структура О-антигена *Salmonella enterica* O47, содержащего фосфат рибита и 2-ацетимидоиламино-2,6-дидезокси-L-галактозу // Биохимия. 2009. Т. 74. № 4. С. 515–521.
- Perepelov A.V., Liu B., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Feng L., Wang L., Knirel Yu.A. Structure of O-antigen and functional characterization of O-antigen gene cluster of *Salmonella enterica* O47 containing ribitol phosphate and 2-acetimidoylamino-2,6-dideoxy-L-galactose // Biochemistry. 2009. V. 74. P. 416–420.
- Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. № 4. С. 497–502.
- Смолякина О.Н., Шишонкова Н.С., Юрасов Н.А., Игнатов В.В. Капсульные и экстраклеточные полисахариды diazотрофных бактерий *Herbaspirillum seropedicae* Z78 // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 345–352.
- Smol'kina O.N., Shishonkova N.S., Yurasov N.A., Ignatov V.V. Capsular and extracellular polysaccharides of the diazotrophic rhizobacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z78 // Microbiology. 2012. V. 81. P. 317–323.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Olivares F.L., Döbereiner J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans* // Symbiosis. 1992. V. 13. P. 65–73.
- Balsanelli E., Tuleski T.R., de Baura V.A., Yates M.G., Chubatsu L.S., Pedrosa F.O., de Souza E.M., Monteiro R.A. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides // PLoS One. 2013. V. 8. e77001. doi 10.1371/journal.pone.0077001
- Bock K., Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
- Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 1673–1685.
- Conrad H.E. Methylation of carbohydrates with methylsulfanyl anion and methyl iodide in dimethyl sulfoxide // Methods Carbohydr. Chem. 1972. V. 6. P. 361–364.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids // Analyt. Biochem. 1982. V. 126. P. 131–138.
- Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
- Komaniecka I., Zdzisinska B., Kandefer-Szerszen M., Choma A. Low endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Azospirillum* strains // Microbiol. Immunol. 2010. V. 54. P. 717–725.
- Kondakova A.N., Fudala R., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Knirel Yu.A., Kaca W. Structure of a lactic acid ether-containing and glycerol phosphate-containing O-polysaccharide from *Proteus mirabilis* O40 // Carbohydr. Res. 2005. V. 340. P. 1612–1617.
- Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
- Mayer H., Tharanathan R.N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria // Methods Microbiol. 1985. V. 18. P. 157–207.
- Monteiro R.A., Balsanelli E., Tuleski T., Faoro H., Cruz L.M., Wasseem R., de Baura V.A., Tadra-Sfeir M.Z., Weiss V., Da-Rocha W.D., Muller-Santos M., Chubatsu L.S., Huergo L.F., Pedrosa F.O., de Souza E.M. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 80. P. 441–451.
- Naumova I.B., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Kozlova Y.I., Potekhina N.V., Evtushenko L.I., Stackebrandt E. Cell wall teichoic acids: structural diversity, species specificity in the genus *Nocardiopsis*, and chemotaxonomic perspective // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. P. 269–284.
- Pedraza R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria // Int. J. Food Microbiol. 2008. V. 125. P. 25–35.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T. Life in grasses: diazotrophic endophytes // Trends Microbiol. 1998. V. 139. P. 139–144.
- Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1604.
- Serrato R.V. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria // Front. Cell Infect. Microbiol. 2014. V. 4. 119. doi 10.3389/fcimb.2014.00119
- Serrato R.V., Sasaki G.L., Cruz L.M., Carlson R.W., Muszynski A., Monteiro R.A., Pedrosa F.O., Souza E.M., Iacomoni M. Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum* // Can. J. Microbiol. 2010. V. 56. P. 342–347.
- Serrato R.V., Balsanelli E., Sasaki G.L., Carlson R.W., Muszynski A., Monteiro R.A., Pedrosa F.O., Souza E.M., Iacomini M. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid A and of two mutants defective to colonize maize roots // Int. J. Biol. Macromol. 2012. V. 51. P. 384–391.

Shashkov A.S., Wang M., Turdymuratov E.M., Hu Sh., Arbatsky N.P., Guo X., Wang L., Knirel Yu.A. Structural and genetic relationships of closely related O-antigens of *Cronobacter* spp. and *Escherichia coli*: *C. sakazakii* G2594 (serotype O4)/*E. coli* O103 and *C. malonicus* G3864 (serotype O1)/*E. coli* O29 // Carbohydr. Res. 2015. V. 404. P. 124–131.

Schletter J., Heine H., Ulmer A.J., Rietschel E.T. Molecular mechanisms of endotoxin activity // Arch. Microbiol. 1995. V. 164. P. 383–389.

Tsai C.M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.

Zhao L., Ohtaki Yu., Yamaguchi K., Matsushita M., Fujita T., Yokochi T., Takada H., Endo Ya. LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system // Blood. 2002. V. 100. P. 3233–3239.

Zych K., Toukach F.P., Arbatsky N.P., Kołodziejaska K., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Knirel Yu.A., Sidoreczyk Z. Structure of the O-specific polysaccharide of *Proteus mirabilis* D52 and typing of this strain to *Proteus* serogroup O33 // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 4346–4351.

Wu C.H., Chen T.L., Chen T.G., Ho W.P., Chiu W.T., Chen R.M. Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages // J. Trauma. 2003. V. 55. P. 540–545.

Structural Peculiarities and Biological Properties of the Lipopolysaccharide from *Herbaspirillum Seropedicae* Z78

N. S. Velichko^{1, *}, A. K. Surkina¹, Y. P. Fedonenko^{1, 2}, E. L. Zdorovenko³, and S. A. Konnova^{1, 2}

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

²Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia

³Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: velichko_n@ibppm.ru

Received February 12, 2018

Abstract—Lipopolysaccharide was isolated by phenol extraction from the surface membrane of the nitrogen-fixing endophytic rhizobacterium *Herbaspirillum seropedicae*, type strain Z78. The lipopolysaccharide's lipid A contained 3-hydroxydecanoic, 3-hydroxydodecanoic, dodecanoic, tetradecanoic, and hexadecanoic acids. The 3-hydroxydodecanoic acid was amide-linked to the sugar backbone of the lipid A. The structure of the O polysaccharide from *H. seropedicae* Z78 was established for the first time. It is characterized by heterogeneity and by the presence of glycerol, a component rarely found in gram-negative bacteria. The O polysaccharide of *H. seropedicae* Z78 was found to consist of two types of repeating units: one represented by glycerol-1-phosphate and the other by the glycerol-1-phosphate of the backbone, which is substituted at the 2-position by N-acetyl-D-glucosamine. The lipopolysaccharide of the *H. seropedicae* Z78 was weakly toxic to warm-blooded animals and moderately and dose-dependently induced interleukin synthesis by human whole blood cells and NO synthesis by mouse splenocytes. This may indicate that the *H. seropedicae* lipopolysaccharide is a promising antagonist of classical endotoxins.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*, lipopolysaccharide, O polysaccharide, structure

ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОСИСТЕМ ВЫСОКИХ ШИРОТ

© 2018 г. Т. В. Антипова^а, В. П. Желифонова^а, Б. П. Баскунов^а,
Г. А. Кочкина^а, С. М. Озерская^а, А. Г. Козловский^{а, *}

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушchino, Россия

*e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 29.03.2018 г.

Проведен анализ вторичных метаболитов у 25 штаммов пенициллов, выделенных из экосистем высоких широт: верхнего слоя антарктических грунтов и многолетнемерзлых отложений Арктики. Установлено, что 80% исследованных штаммов продуцировали вторичные метаболиты, которые относились к бензadiaзепиновым алкалоидам (анацин, циклопенин, циклопептин), хинолиновым алкалоидам (виридикатин, 3-метоксивиридикатин), дикетопиперазиновым алкалоидам (аурантамин, 3,12-дигидророкефортин, рокефортин, ругулозувин В), полициклическим индольным алкалоидам (коммунезин В, хетоглобозин А), клавиновым эргоалкалоидам (ругуловазины А и В, фестуклавин, фунигаклавины А и В, циклопиазоновая кислота), поликетидам (микофеноловая кислота, цитреовиридин), терпенам (андрастины А и С, фоменон) и N-ацетилтриптамину. У большинства штаммов грибов подрода *Penicillium*, выделенных из антропогенно нарушенных верхних слоев антарктических отложений и подповерхностных арктических отложений, наблюдался более полный спектр вторичных метаболитов по сравнению с тремя штаммами, выделенными из многолетнемерзлых отложений, имеющих возраст от 15 до 600 тыс. лет. Впервые обнаружено образование андрастинов штаммом вида *P. restrictum*. Показано широкое распространение ругуловазинов у грибов вида *P. variable*.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, *Penicillium*, вторичные метаболиты, хемотаксономия, Антарктида, Арктика

DOI: 10.1134/S0026365618050038

Экосистемы высоких широт рассматриваются как местообитания с экстремальными экологическим факторами, где низкие эукариотические организмы адаптированы к жестким условиям существования. Низкие температуры являются основным стрессором, который влияет на стратегии адаптации организмов и приводит к появлению психротолерантных и психрофильных штаммов. В этих условиях вода становится малодоступной для организмов, растительный покров носит очаговый характер, а накопление биомассы в почве происходит крайне медленно. Все это приводит к низкому содержанию органического вещества в грунтах и первичных почвах и к аккумуляции солей.

Тем не менее, многолетнемерзлые отложения являются прекрасной природной средой для сохранения огромного пула микроорганизмов в жизнеспособном состоянии. Анализ грибного разнообразия в большом числе образцов многолетнемерзлых отложений, криопегов, палеосемян, хранившихся в мерзлых толщах, позволяет выявить повторяющиеся таксоны, имеющие высокую частоту встречаемости в холодных местообитаниях. К ним относятся виды грибов рода

Penicillium (Кочкина и соавт., 2014; Ivanushkina et al., 2005). Кроме того, в высоких широтах антропогенное воздействие на биоценозы приводит к изменению видового состава и появлению интродуцированных видов грибов *Penicillium*.

Ранее проведенные исследования показали, что различные виды грибов рода *Penicillium*, выделенные из регионов многолетней мерзлоты, продуцируют разнообразные вторичные метаболиты, многие из которых являются микотоксинами (Kozlovsky et al., 2014). Известно, что ряд психротолерантных грибов имеет более высокую скорость роста при пониженных температурах и более низкую при 25°C, чем изоляты тех же видов из образцов умеренной зоны, что затрудняет их идентификацию (Ozerskaya et al., 2008). Поэтому использование физиологических критериев, а также макро- и микроморфологических признаков в сочетании с профилями экзозимов позволяет уточнить видовую принадлежность исследованных штаммов в соответствии с таксономическими схемами данной группы грибов (Samson, Frisvad, 2004; Houbraeken et al., 2011).

Цель работы – изучение спектра экзометаболизмов у грибов рода *Penicillium*, выделенных из экосистем высоких широт, и уточнение их таксономического положения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили 25 штаммов грибов рода *Penicillium*, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН. Номера штаммов, источники и места их выделения представлены в табл. 1.

При идентификации штаммов использовали макро- и микроморфологические признаки 7-суточных культур, выращенных при различных температурах (5, 25, 30, 37°C) на стандартных питательных агаризованных средах (CYA, MEA, YES, CYAS) в соответствии с известными схемами определения (Pitt, 1979; Samson, Frisvad, 2004), а также профили их экзометаболизмов (Samson, Frisvad, 2004; Frisvad et al., 2004).

При изучении продукции вторичных метаболитов грибы выращивали в двух жидких средах. На среде Чапека с дрожжевым экстрактом (0.5%) штаммы культивировали поверхностно. В среде другого состава (г/л дистиллированной воды: маннит – 50.0; янтарная кислота – 5.4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.3; KH_2PO_4 – 1.0; pH доводили до 5.4 25%-ным раствором NH_4OH), проводили глубинное культивирование на качалке (220 об./мин). Грибы выращивали при $24 \pm 1^\circ C$ в колбах объемом 750 мл в 150 мл жидкой среды. Засев сред осуществляли водной споровой суспензией ($1-2 \times 10^6$ конидий/мл) 14-суточных культур, выращенных на поверхности скошенного мальц-агара. Отбор проб при глубинном культивировании проводили на 10-е сут, а при поверхностном на 21-е сут роста.

Метаболиты кислой, нейтральной и щелочной природы извлекали из фильтрата культуральной жидкости трехкратной экстракцией хлороформом при pH 3 и pH 8. Анализ экстрактов осуществляли методом ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системах I и II: хлороформ–метанол–25%-ный NH_4OH (90 : 10 : 0.1) (I) и хлороформ–ацетон (93 : 7) (II). Вещества обнаруживали по поглощению и флуоресценции в УФ-свете (264 и 360 нм) и после опрыскивания пластин реактивом Драгендорфа для обнаружения азотсодержащих метаболитов, реактивом Эрлиха – индольных алкалоидов и 5%-раствором $FeCl_3$ в метаноле – фенольной группы.

Выделение и очистку метаболитов проводили препаративной ТСХ на пластинах силикагеля. Идентификацию метаболитов осуществляли сохроматографией со стандартными образцами, а также используя данные УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии, и сравнением их с литера-

турными источниками (Cole, Schweikert, 2003) и базами данных (<http://dnpc.chemnetbase.com>).

УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япония). Масс-спектры соединений регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (“Thermo Finnigan”, Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в камеру для химической ионизации при атмосферном давлении. Сбор и обработку масс-спектрометрических данных осуществляли с помощью программного обеспечения Xcalibur. Более полную информацию по структуре экзометаболизмов получали при анализе МС/МС спектров при энергии коллизии 20–40% как в положительных, так и в отрицательных ионах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что 20 исследованных штаммов продуцируют вторичные метаболиты различных структурных типов. Штаммы ВКМ F-4791, ВКМ F-4792, ВКМ F-4793, ВКМ F-4797, ВКМ F-4803, ВКМ F-4804, ВКМ F-4810 синтезировали метаболиты 1 и 2, которые реагировали с реактивом Эрлиха с образованием желто-зеленого окрашивания. УФ-спектры и МС/МС спектры выделенных метаболитов соответствовали бензодиазепиновым алкалоидам циклопенину и циклопептину (табл. 2). Кроме них у этих штаммов обнаружены метаболиты 3 и 4, реагирующие с раствором $FeCl_3$ в метаноле, которые по своим характеристикам совпадали с хинолиновыми алкалоидами – виридикатином и 3-метоксивиридикатином. Все эти метаболиты связаны единой биосинтетической цепочкой, их предшественниками являются антралиловая кислота, метионин и фенилаланин. Кроме метаболитов 1–4 штаммы ВКМ F-4791, ВКМ F-4792, ВКМ F-4793 и ВКМ F-4803 синтезировали метаболит 5, который давал положительную реакцию с реактивом Драгендорфа. В УФ-спектре этот метаболит имел ряд полос поглощения с λ_{max} 224, 270, 276, 304 и 317 нм. Масс-спектр метаболита 5 регистрировался в положительных и отрицательных ионах, которые указывали на молекулярную массу соединения 342 Да. На основании полученных характеристик данный метаболит был идентифицирован как бензодиазепиновый алкалоид анацин. Помимо указанных метаболитов у этих штаммов обнаружен метаболит 6, который давал серо-голубое окрашивание с реактивом Эрлиха. На основании данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии (табл. 2) этот метаболит был идентифицирован как дикетопиперазиновый алкалоид ругулозувин В (другие названия – пуберулин, фруктигенин А).

Штамм ВКМ F-4804, помимо виридикатинов и циклопенинов, синтезировал также

Таблица 1. Изученные штаммы грибов рода *Penicillium*

Номер ВКМ	Номер рабочий	Образец	Характеристика образца	Место отбора
F-4791	2015-4-11	LA56-Bn-03	Дорожная колея гусеничной техники, глубина 0–5 см	Научная станция “Оазис”, оазис Бангера, земля Уилкса, Антарктида
F-4792	2015-8-35	скв. 4/13	Многолетнемерзлые отложения, глубина 2.5 м	Гыданская губа, Едома, Арктика
F-4793	2015-9-37	скв. 4/13	Многолетнемерзлые отложения, глубина 3.5 м	Гыданская губа, Едома, Арктика
F-4794	2015-11-73	LA56-Dr-01 (инс)	Грунт поблизости от инсинераторной установки, сжигающей бытовые отходы и работающей на дизельном топливе, глубина 0–5 см	Станция “Дружная-4”, нунатак Лэндинг, земля Мак-Робертсон, Антарктида
F-4795	2015-11-69	LA56-Dr-01 (инс)	Грунт поблизости от инсинераторной установки, сжигающей бытовые отходы и работающей на дизельном топливе, глубина 0–5 см	Станция “Дружная-4”, нунатак Лэндинг, земля Мак-Робертсон, Антарктида
F-4796	2015-12-31	LA56-Dr-01 (н/п)	Грунт около места утечки нефтепродуктов в месте массового складирования 200-литровых бочек, глубина 0–5 см	Станция “Дружная-4”, нунатак Лэндинг, земля Мак-Робертсон, Антарктида
F-4797	2015-18-127	LA57-Vl-04 (1)	Грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина 0–5 см	Станция “Беллингаузен”, остров Кинг-Джордж, Антарктида
F-4798	2015-18-95	LA57-Vl-04 (1)	Грунт дорожной колеи в непосредственной близости от ДЭС, глубина 0–5 см	Станция “Беллингаузен”, остров Кинг-Джордж, Антарктида
FW-3324	2016-4-40	LA57-Nl-09 (ДЭС)	Грунт в непосредственной близости от ДЭС, глубина 0–5 см	Станция “Новолазаревская”, юго-восточная часть оазиса Ширмахера, Антарктида
F-4799	2016-8-12	скв. 2/13	Многолетнемерзлые отложения, супесь с прослоями торфа, обломки панцирей диатомей класса <i>Centricae</i> , спикулы губок, засоленная, глубина 2 м, возраст 15 тыс. лет	Ямало-Ненецкий автономный округ Тюменская обл., п-ов Мамонта, Арктика
FW-3337	2016-9-15	скв. 4/13	Многолетнемерзлые отложения, пески и супеси с корнями растений, обнаружены единичные пресноводные диатомовые, глубина 4.0–4.5 м, возраст 34.3 тыс. лет	Ямало-Ненецкий автономный округ Тюменская обл., п-ов Мамонта, Арктика
F-4800	2016-9-56	скв. 4/13	Многолетнемерзлые отложения, пески и супеси с корнями растений, обнаружены единичные пресноводные диатомовые, глубина 4.0–4.5 м, возраст 34.3 тыс. лет	Ямало-Ненецкий автономный округ Тюменская обл., п-ов Мамонта, Арктика
FW-3339	2016-10-57	скв. 3/15	Многолетнемерзлые отложения, пылеватый суглинок, глубина 3.5 м, возраст 600 тыс. лет	Колымская низменность, устье р. Алазея, Арктика

Таблица 1. Окончание

Номер ВКМ	Номер рабочий	Образец	Характеристика образца	Место отбора
FW-3340	2016-10-58	скв. 3/15	Многолетнемерзлые отложения, пылеватый суглинок, глубина 3.5 м, возраст 600 тыс. лет	Колымская низменность, устье р. Алазея, Арктика
FW-3342	2016-11-17	скв. 3/15	Многолетнемерзлые отложения, пылеватый суглинок, глубина 7.2–7.25 м, возраст 600 тыс. лет	Колымская низменность, устье р. Алазея, Арктика
F-4801	2016-11-60	скв. 3/15	Многолетнемерзлые отложения, пылеватый суглинок, глубина 7.2–7.25 м, возраст 600 тыс. лет	Колымская низменность, устье р. Алазея, Арктика
F-4802	2016-16-20	В1-94	Грунт, горизонт Ch (2), заселенный минеральный субстрат под моховыми подушками в 300 м от нефтебазы, глубина 8–20 см	Станция “Беллинсгаузен”, остров Кинг-Джордж, Антарктида
F-4803	2016-19-74	В1-95	Грунт, старый разлив нефтепродуктов с альго-бактериальными матами, глубина 0–10 см	Станция “Беллинсгаузен”, остров Кинг-Джордж, Антарктида
F-4804	2016-19-75	В1-95	Грунт, старый разлив нефтепродуктов с альго-бактериальными матами, глубина 0–10 см	Станция “Беллинсгаузен”, остров Кинг-Джордж, Антарктида
F-4805	156-2-27	15/99	Многолетнемерзлые отложения, глубина 21–21.2 м, возраст 100–120 тыс. лет	Колымская низменность, тундровая зона под мысом Чукочьим, Арктика
F-4806	192-1-123	2000	Многолетнемерзлые отложения, глубина 3 м, возраст 15–40 тыс. лет	Колымская низменность, Халерчинская тундра, Арктика
F-4807	120-1-95	1/98	Многолетнемерзлые отложения, глубина 3 м, возраст 1800–3000 тыс. лет	Колымская низменность, среднее течение р. Алазея, Арктика
F-4808	128-1-105	1/98	Многолетнемерзлые отложения, глубина 20 м, возраст 3000 тыс. лет	Колымская низменность, среднее течение р. Алазея, Арктика
F-4809	117-1-5	3/93	Многолетнемерзлые отложения, глубина 4.6 м, возраст 200–400 тыс. лет	Колымская низменность, верховья р. Бол. Хомус – Юрях, Арктика
F-4810	Sp-1		Контаминантный киллер культуры простейших, выделенной из многолетнемерзлых отложений	Колымская низменность, Арктика

метаболизму 7, который давал фиолетовое окрашивание с реактивом Эрлиха, указывающее на наличие индольной структуры в данном соединении. Данный метаболит был идентифицирован как N-ацетилтриптами́н.

У штаммов ВКМ F-4795, ВКМ F-4797, ВКМ F-4798 и ВКМ F-4810 обнаружен метаболит 8, развивающийся с реактивом Эрлиха сначала желтое, а со временем голубое окрашивание, что характерно для дикетопиперазинового алкалоида рокефортина. Сохроматография со стандартным

образцом и полученные характеристики выделенного метаболита (табл. 2) полностью это подтвердили. Кроме него у штаммов ВКМ F-4797 и ВКМ F-4810 был обнаружен метаболит 9, который является предшественником рокефортина – 3,12-дигидророкефортин (рокефортин D). У штамма ВКМ F-4798 был обнаружен метаболит 10, который в видимом свете имел желтоватый цвет и развивал с реактивом Эрлиха фиолетовое окрашивание. УФ-спектр этого метаболита имел характерные полосы поглощения для индольного хромофора с

Таблица 2. Физико-химические свойства выделенных метаболитов

№	Метаболит	УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм	Энергия коллизии/молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС спектрах (интенс. %)	
			[M - H] ⁻	[M + H] ⁺
1	Циклопенин	213, 290	23/293(100), 250(21), 236(65), 222(25), 159(22)	22/295(100), 267(48), 251(46), 177(65)
2	Циклопептин	213, 290	28/279(100), 261(58)	28/281(100), 253(35), 134(30), 120(54)
3	Виридикатин	225, 240, 287, 309, 330	42/236(100), 208(75)	39/238(100), 223(12), 220(40), 210(70), 192(68), 182(19), 132(57)
4	3-метоксивиридикатин	225, 282, 324, 337	38/250(95), 235(83), 222(64), 207(100)	34/252(100), 237(84)
5	Анацин	226, 270, 277, 303, 317	26/341(100), 270(90)	21/343(87), 326(100)
6	Ругулозувин В	212, 245, 275, 284	29/442(100), 400(9), 351(73)	25/444(5), 443(30), 442(100), 441(77), 400(39), 374(79)
7	N-ацетилтриптамин	206, 278, 288	—	23/203(91), 202(31), 186(19), 161(15), 144(100)
8	Рокефортин	208, 238, 325	34/388(100), 190(78)	29/390(86), 322(100), 193(43)
9	3,12-дигидророкефортин	209, 244, 301	22/390(100), 322(11), 205(49)	25/392(100), 324(98)
10	Хетоглобозин А	223, 274, 282, 291	32/527(100), 528(62), 509(61), 484(44), 466(23), 398(85)	23/529(100), 511(96), 493(19), 400(10), 328(21)
11	Коммунезин В	210, 265	31/507(58), 508(87), 449(100), 437(25), 413(32), 406(10), 355(22)	27/509(70), 451(17), 437(100), 185(35)
12	ЦПК	223, 251(пл.), 281, 290	37/335(100), 180(71), 140(53)	24/337(91), 196(100), 182(83)
13	Фестуклавин	224, 275, 280, 292	33/238(100), 239(49), 223(55), 208(14)	34/241(100), 210(71)
14	Фумигакалавин А	224, 275, 282, 292	29/297(100), 237(61)	28/299(100), 239(84)
15	Фумигакалавин В	222, 275, 281, 293	39/255(100), 185(90), 154(56)	25/257(100), 239(48)
16	Аурангиамин	231, 320	34/301(100), 286(13), 258(26), 232(65)	30/303(100), 275(34), 235(75), 176(38)
17	МФК	221, 249, 304	31/319(100), 287(99), 275(30), 191(12), 179(13)	95/321(100), 303(48), 275(57), 207(84)
18	Цитреовиридин А	204, 236, 296, 388	30/401(100), 386(17), 383(37), 369(27), 357(45), 339(46), 313(70), 300(97), 295(26), 283(26), 243(22)	26/403(100), 315(95), 297(45), 285(31), 259(21)
19	Андрастин А	211, 235 (пл.), 250 (пл.), 286	31/485(100), 453(99), 425(19)	20/487(80), 427(100), 409(17), 395(11)
20	Андрастин С	211, 235 (пл.), 250 (пл.), 286	—	18/473(84), 441(100), 413(2)
21	Фоменон	241	—	19/265(84), 247(100), 229(14), 175(18)
22	Ругуловазин А	224, 277, 286, 295	26/267(65), 266(25), 249(12), 223(100)	29/269(100), 251(95), 235(22), 238(22), 196(64)
23	Ругуловазин В	224, 277, 286, 295	26/267(65), 266(25), 249(12), 223(100)	29/269(100), 251(95), 235(22), 238(22), 196(64)

λ_{\max} 223, 274, 282 нм. Масс-спектр метаболита 10 показал положительный молекулярный ион 529 ($M + H$)⁺ и отрицательный молекулярный ион 527 ($M - H$)⁻, которые указывали на молекулярную массу соединения 528 Да. На основании полученных данных этот метаболит был идентифицирован как хетоглобозин А. Данное соединение относится к цитохалазановым алкалоидам, содержащим индольное кольцо (Cole, Schweikert, 2003). Штамм ВКМ F-4798 также синтезировал метаболит 11, который имел с реактивом Эрлиха желтое окрашивание. УФ-спектр содержал полосы поглощения с λ_{\max} 210, 265 нм. Молекулярная масса метаболита по данным масс-спектрометрии была определена как 508 Да. На основании полученных результатов этот метаболит был идентифицирован как индольный алкалоид коммунезин В. Предполагают, что коммунезин В образуется в результате окислительной конденсации триптамина и клавиного алкалоида аурантиоклафина (Trost, Osipov, 2015).

У двух штаммов ВКМ F-4799 и ВКМ F-4802 в кислых экстрактах был обнаружен метаболит 12, дающий с реактивом Эрлиха фиолетовое окрашивание. На основании физико-химических характеристик выделенного метаболита и прямого сравнения со стандартным образцом данное соединение было идентифицировано как клавиновый эргоалкалоид α -циклопиазоновая кислота (ЦПК). У штамма ВКМ F-4802 в щелочном экстракте были обнаружены еще три метаболита 13–15, содержащих индол, которые были идентифицированы клавиновые эргоалкалоиды – фестуклафин, фумигаклафин А и фумигаклафин В (табл. 2).

Штамм ВКМ F-4800 синтезировал метаболит 16, который давал положительную реакцию с реактивом Драгендорфа. В УФ-спектре соединения наблюдали две типичные для многих дикетопиперазиновых алкалоидов полосы поглощения с λ_{\max} 231, 320 нм. Масс-спектр метаболита 16 показал положительный молекулярный ион 303 ($M + H$)⁺ и отрицательный молекулярный ион 301 ($M - H$)⁻, которые указывали на молекулярную массу соединения 302 Да. Сохроматография со стандартным образцом и полученные характеристики совпадали с аурантиамином; это циклический дипептид, дикетопиперазиновое ядро которого образуется из валина и гистидина.

У штамма ВКМ F-4801 был обнаружен метаболит 17, который реагировал с хлорным железом. Сохроматографией со стандартным образцом и на основе данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии метаболит был идентифицирован как микофеноловая кислота (МФК). Продукция МФК этим штаммом при культивировании в минеральной среде составила 364 мг/л. Биосинтез микофеноловой кислоты был обнаружен и у штамма ВКМ F-4795. Однако синтез этого соеди-

нения наблюдался только при определенных условиях, а именно на среде Чапека с дрожжевым экстрактом. В минеральной среде штамм синтезировал только рокефортин.

Штамм ВКМ F-4794 образовывал желтый пигмент (метаболит 18), который имел желтую флуоресценцию в УФ-свете (полосы поглощения с λ_{\max} 204, 234, 283, 293 и 384 нм). Масс-спектр метаболита показал положительный молекулярный ион 403 ($M + H$)⁺ и отрицательный молекулярный ион 401 ($M - H$)⁻. Данные характеристики соответствовали поликетиду цитреовиридину А, имеющему полиеновую структуру, содержащую пиррол.

Штамм ВКМ F-4796 синтезировал два метаболита – 19 и 20, которые имели одинаковые УФ-спектры с λ_{\max} 211, 235 (пл.), 250 (пл.), 286 нм, что предполагало сходные структуры у этих соединений. УФ-спектр метаболитов в метаноле с 0.01 н HCl имел батохромный сдвиг с λ_{\max} 209, 235 (пл.) 258, 300 (пл.) нм. Масс-спектры метаболитов характеризовались молекулярными ионами 486 и 472. Эти метаболиты были идентифицированы как андрастины А и С соответственно (Omura et al., 1996). Андрастины имеют тетрациклическую структуру и относятся к терпеноидам. Кроме того, на среде Чапека с дрожжевым экстрактом этот штамм синтезировал метаболит 21, обладающий молекулярной массой 264 Да и имеющий УФ-спектр с λ_{\max} 241 нм. Этот метаболит был идентифицирован как сесквитерпен фоменон (Isaka et al., 2000).

Пять штаммов ВКМ F-4805, ВКМ F-4806, ВКМ F-4807, ВКМ F-4808, ВКМ F-4809 синтезировали два метаболита – 22 и 23, которые различались по хроматографической подвижности. Они давали реакцию с реактивом Эрлиха, характерную для индольного хромофора, данные УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии были идентичны. Сохроматографией со стандартными образцами и на основании полученных физико-химических характеристик эти метаболиты были идентифицированы как клавиновые эргоалкалоиды ругуловазины А и В.

Таким образом, установлено, что 20 из числа исследованных штаммов продуцировали вторичные метаболиты, которые относились к бензидазепиновым алкалоидам (анацин, циклопенин, циклопептин), хинолиновым алкалоидам (виридикатин, 3-метоксивиридикатин), дикетопиперазиновым алкалоидам (аурантиамин, 3,12-дигидро-рокефортин, рокефортин, ругулозувин В), полициклическим индольным алкалоидам (коммунезин В, хетоглобозин А), клавиновым эргоалкалоидам (ругуловазины А и В, фестуклафин, фумигаклавины А и В, ЦПК), поликетидам (МФК, цитреовиридин А), терпенам (андрастины А и С, фоменон) и N-ацетилтриптамину. У 5 штаммов (ВКМ FW-3324, ВКМ FW-3339, ВКМ FW-3340,

ВКМ FW-3337 и ВКМ FW-3342) вторичные метаболиты не были обнаружены.

Для идентифицированных метаболитов известна разнообразная биологическая активность. Некоторые из них, такие как рокефортин и ЦПК, относятся к микотоксинам. Токсическое действие ЦПК характеризуется быстрым развитием симптомов поражения центральной нервной системы и некротическими изменениями внутренних органов. Ее действие объясняется способностью изменять нормальный поток внутриклеточного кальция через специфическое ингибирование кальций-зависимой АТФазы (Burdock, Flamm, 2000). Для рокефортина показаны нейротоксические, треморгенные, антибиотические и антипротозойные свойства (Lowes et al., 1992). Андрастин является мощными ингибиторами фарнезилтрансферазы, основного фермента биосинтеза холестерина (Omura et al., 1996). Известно также, что андрастин А проявляет сильные противоопухолевые свойства, специфически блокирует функцию белка Рах, а также способствует внутриклеточному накоплению противораковых соединений в опухолевых клетках. Фоменон проявляет антималярийную активность и противомикробные свойства (Isaka et al., 2000). Коммунезин В обладает высокой цитотоксичностью против культур клеток лейкемии человека P388 с ED₅₀ 0.45 мкг/мл (Trost, Osipov, 2015). Хетоглобозин А проявляет антибактериальную, антигрибковую и противоопухолевую активности, а также фитотоксичность, что может найти применение при разработке новых гербицидов (Jiang et al., 2017). Цитреовиридин А относится к классу ингибиторов F(1)-субъединицы АТФ-синтазы. МФК обладает выраженным иммунодепрессивным действием и используется в качестве профилактики острого отторжения трансплантата у больных с аллогенными трансплантатами почки. Фестуклавин обладает высокой антибиотической активностью по отношению к болезнетворным бактериям, включая *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Matuschek et al., 2011). Таким образом, в процессе скрининга штаммов грибов были найдены новые продуценты биологически активных соединений, которые могут быть перспективны для биотехнологии.

Макро- и микроморфологические признаки штаммов, выделенных из низкотемпературных экотопов, соответствовали различным видам пенициллов подродов *Furcatum* (2 штамма), *Aspergilloides* (4 штамма), *Penicillium* (13 штаммов) и *Biverticillium* (6 штаммов). Видовая идентификация этих штаммов по морфологическим признакам была затруднена, так как культуры имели отличия в скоростях роста при разных температурах, форме конидий, интенсивности и цвету выделяемого в среду пигмента по сравнению с известными диагностическими признаками. В связи с этим,

уточнение видовой идентификации проводили с использованием состава экзометаболитов.

13 изученных штаммов грибов подрода *Penicillium* по спектру синтезированных метаболитов можно разделить на две группы. У первой группы идентифицированы основные диагностические маркерные экзометаболиты видов (табл. 3). Биосинтез анацина, виридикатинов, ругулозувина В и циклопенинов штаммами ВКМ F-4791, ВКМ F-4792, ВКМ F-4793 и ВКМ F-4803 соответствовал виду *P. polonicum*. Биосинтез виридикатинов, 3,12-дигидророкефортина, рокефортина и циклопенинов штаммами ВКМ F-4797 и ВКМ F-4810 позволил отнести их к виду *P. crustosum*. Спектр синтезированных метаболитов штаммом ВКМ F-4798 (коммунезин В, рокефортин и хетоглобозин А) характерен для вида *P. expansum*. Биосинтез фестуклавина, фумигаклавинов А и В, ЦПК штаммом ВКМ F-4802 однозначно указывал на вид *P. palitans*. Биосинтез МФК и рокефортина, а также хороший рост штамма ВКМ F-4795 на среде Чапека–Докса с 0.5% уксусной кислотой свидетельствовал о принадлежности к виду *P. roqueforti*. Биосинтез N-ацетилтриптамина, виридикатинов и циклопенинов штаммом ВКМ F-4804 известен для вида *P. solitum*. Таким образом, основные маркерные метаболиты позволили уточнить видовой диагноз этих штаммов и отнести их к видам *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. palitans*, *P. polonicum*, *P. roqueforti*, *P. solitum*. Данные штаммы были выделены из поверхностных отложений вблизи трех научных станций в Антарктиде, на которые длительное время действовали антропогенные факторы, а также из более глубоких многолетнемерзлых отложений Арктики, включая культуру контаминанта простейших, выделенных из арктических грунтов (табл. 1).

У второй группы штаммов грибов подрода *Penicillium* спектр идентифицированных экзометаболитов был представлен одним соединением. У ВКМ F-4799 была идентифицирована ЦПК – один из хемотаксономических маркеров вида *P. palitans*. Биосинтез МФК штаммом ВКМ F-4801 указывал на вид *P. brevicompactum*. У штамма ВКМ F-4800 был обнаружен только аурантиамин. Это соединение – хемотаксономический маркер видов *P. aurantiogriseum*, *P. freii* (серия *Viridicata*) и *P. cavernicola* (серия *Solita*). Может встречаться у *P. neoehinulatum* (серия *Viridicata*). На основании морфологических признаков и биосинтеза аурантиамина этот штамм был отнесен к виду *P. aurantiogriseum*.

У видов грибов подродов *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* спектр экзометаболитов исследован недостаточно полно и продолжает изучаться в настоящее время. Макро- и микроморфологические признаки штамма ВКМ F-4796 соответствовали подроду *Aspergilloides* секции *Ex-*

Таблица 3. Экзометаболиты грибов рода *Penicillium*, выделенных из различных экосистем высоких широт

№№ п/п	Название вида	Номер ВКМ	Идентифицированные экзометаболиты	Видовые диагностические маркерные экзометаболиты
1	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx 1901	F-4800	Аурантиамин	Анацин Аурантин Аурантиамин Веррукозидин Пеницилловая кислота Псеуротин (Samson, Frisvad, 2004)
2	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx 1901	F-4801	МФК	Бревианамид А МФК Пебролиды Фенолы Райстрика (Samson, Frisvad, 2004)
3	<i>P. citreonigrum</i> Dierckx 1901	F-4794	Цитреовиридин	Цитреовиридин* (Mantle, 1987)
4	<i>P. citrinum</i> Sopp 1912	FW-3339	Не обнаружены	Антрахиноны Перинадины Цитринин Цитринадины Хинолактацины (Houbraken et al., 2011)
5	<i>P. crustosum</i> Thom 1930	F-4810	Виридикатин	Виридикатины Пенитрем А Рокефортины Террестриковая кислота Циклопенины (Samson, Frisvad, 2004)
6		F-4797	3-метоксивиридикатин Рокефортин 3,12-дигидророкефортин Циклопенин Циклопептин	
7	<i>P. dierckxii</i> Biourge 1923	FW-3340	Не обнаружены	Антрахиноны Перинадины Цитринин Цитринадины Хинолактацины (Houbraken et al., 2011)
8	<i>P. expansum</i> Link 1809	F-4798	Коммунезин В Рокефортин Хетоглобозин А	Коммунезины Патулин Рокефортин Экспансолид Хетоглобозины (Samson, Frisvad, 2004)
9	<i>P. glabrum</i> (Wehmer 1893) Westling 1911	FW-3337	Не обнаружены	Астерриковая кислота Квестин Цитромицетин, Сулохрин и др. (Barreto et. al., 2011)
10		FW-3342		
11	<i>P. palitans</i> Westling 1911	F-4799	ЦПК	Палитантин
12		F-4802	ЦПК Фумигаклавины А и В Фестуклавин	ЦПК Фумигаклавины (Samson, Frisvad, 2004)

Таблица 3. Окончание

№№ п/п	Название вида	Номер ВКМ	Идентифицированные экзометаболиты	Видовые диагностические маркерные экзометаболиты
13	<i>P. polonicum</i> K.M. Zalesky 1927	F-4791	Анацин Циклопенин Циклопептин Виридикатин 3-метоксивиридикатин Ругулозувин В	Пеницилловая кислота Веррукозидин Анацин Ругулозувин Б (пуберулин) Веррукофортин Циклопенины Виридикатины (Samson, Frisvad, 2004)
14		F-4792		
15		F-4793		
16		F-4803		
17	<i>P. restrictum</i> J.C. Gilman et E.V. Abbott 1927	F-4796	Андрастины А и С Фоменон	Глиотоксин* Курвуларин* Патулин* Пеницилловая кислота* Рестриктицин* и др. (Nicoletti, de Stefano, 2012).
18	<i>P. roqueforti</i> Thom 1906	F-4795	Рокефортин МФК	PR-токсин Рокефортин МФК* (Samson, Frisvad, 2004)
19	<i>P. solitum</i> Westling 1911	F-4804	Циклопенин Циклопептин Виридикатин 3-метоксивиридикатин N-ацетилтриптамин	Компактин Циклопенины Виридикатины* (Samson, Frisvad, 2004)
20	<i>P. variable</i> Sopp 1912	FW-3324	Не обнаружены	Ругуловазины* (Kozlovsky et al., 2014)
21		F-4805	Ругуловазины А и В	
22		F-4806		
23		F-4807		
24		F-4808		
25		F-4809		

* Экзометаболиты, которые могут встречаться у грибов данного вида.

ilicaulis виду *P. restrictum*. Штамм продуцировал андрастины А и С, фоменон. Андрастин А описан для некоторых видов грибов секции *Chrysogena*, *P. roqueforti*, *P. crustosum*, *P. corylophilum*, а фоменон – у видов *P. corylophilum* и *P. commune* (Miller, McMullin, 2014). Вид *P. restrictum* широко распространен в различных географических регионах. Это типичный почвенный гриб, но встречается также на растениях, в продуктах питания, в кормах, в фармацевтических препаратах, в воде, воздухе предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции, в библиотеках и т.д. Отдельные представители вида обладают липазной, амилазной, протеазной и другими активностями и используются в биоремедиации почв от тяжелых металлов, углеводов, фенолов, полигидроксикарбонатов, различных пестицидов. Имеются данные об образовании штаммами этого ви-

да микотоксинов – глиотоксина, курвуларина, патулина, пеницилловой кислоты и антифунгального антибиотика рестриктицина (Nicoletti, de Stefano, 2012). Андрастины и фоменон обнаружены впервые у исследованного нами штамма вида *P. restrictum*. Штамм ВКМ F-4796 был выделен на научной станции в Антарктиде в месте утечки нефтепродуктов (табл. 1).

Макро- и микроморфологические признаки штамма ВКМ F-4794 соответствовали подроду *Aspergilloides* секции *Exilicaulis* виду *P. citreonigrum*. У штамма был обнаружен цитреовиридин А. Для некоторых изолятов вида *P. citreonigrum* известна продукция различных экзометаболитов поликетидной структуры, в том числе цитреовиридина (Mantle, 1987). Штамм ВКМ F-4794 был выделен из грунта в непосредственной близости от инсекторной установки, сжигающей бытовые от-

ходы и работающей на дизельном топливе на научной станции в Антарктиде (табл. 1).

Микроморфология штаммов ВКМ F-4805, ВКМ F-4806, ВКМ F-4807, ВКМ F-4808, ВКМ F-4809 и ВКМ FW-3324 была типична для вида *P. variable* (Pitt, 1979). Этот вид отнесен к подроду *Biverticillium* секции *Simplicia*. У пяти штаммов данного вида (кроме ВКМ FW-3324) была обнаружена продукция ругуловазинов А и В, которые являются хемотаксономическими маркерами грибов подрода *Biverticillium*. Ранее биосинтез ругуловазинов был обнаружен у 10 штаммов *P. variable*, выделенных из различных местообитаний (Kozlovsky et al., 2014). Таким образом, биосинтез ругуловазинов достаточно распространен для данного вида, в связи с чем ругуловазины могут считаться его хемотаксономическим маркером.

Ранее по фенотипическим и физиологическим характеристикам штаммы ВКМ FW-3339 и ВКМ FW-3340 были отнесены к подроду *Furcatum* видам *P. citrinum* и *P. dierckxii* соответственно (Pitt, 1979). В настоящее время по фенотипическим и физиологическим характеристикам, а также профилям вторичных метаболитов и ДНК-сиквенсов виды пеницилов подрода *Furcatum* и рода *Eupenicillium* включены в секцию *Citrina* (Houbraken et al., 2011). В новой таксономии вид *P. dierckxii* отнесен к *P. citrinum*. У штаммов ВКМ FW-3339 и ВКМ FW-3340 хемотаксономические маркеры вида *P. citrinum* (цитринин, хинолактаины, цитринадины, перинадины, антрахиноны) не были идентифицированы. Штаммы ВКМ FW-3339 и ВКМ FW-3340 были выделены в Арктике из одного образца многолетнемерзлых отложений с датировкой 600 тыс. лет (табл. 1).

Макро- и микроморфологические признаки штаммов ВКМ FW-3337 и ВКМ FW-3342 соответствовали подроду *Aspergilloides* серии *Aspergilloides* виду *P. glabrum*. У данных штаммов экзометаболические метаболиты идентифицированы не были. Для этого вида известна продукция астерриковой кислоты, цитромицетина, квестина и других метаболитов поликетидной природы (Barreto et al., 2011). Следует отметить, что биосинтез этих экзометаболических метаболитов известен не для всех изолятов вида *P. glabrum*. Так при таксономическом изучении 10 штаммов вида *P. glabrum* выяснилось, что у двух отсутствовал биосинтез экзометаболических метаболитов. Штаммы ВКМ FW-3337 и ВКМ FW-3342 были выделены в различных регионах Арктики из многолетнемерзлых отложений с возрастом 34.3 и 600 тыс. лет соответственно (табл. 1).

Таким образом, исследованные штаммы были отнесены к видам *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. dierckxii*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. palitans*, *P. polonicum*, *P. restrictum*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *P. variable*. Эти виды относятся к космополитам и пси-

хротолерантным видам, встречаются ксеротолерантные организмы, что естественно для аридных условий Антарктиды и Арктики. Благодаря психротолерантности и ксеротолерантности они имеют более высокую скорость роста при пониженных температурах, чем другие виды. Многим грибам, адаптированным к низким температурам, свойственно менять культурально-морфологические признаки.

У штаммов грибов рода *Penicillium*, выделенных из антропогенно нарушенных верхних слоев антарктических и арктических отложений, наблюдался более полный спектр вторичных метаболитов по сравнению с тремя штаммами, выделенными из многолетнемерзлых отложений возрастом от 15 до 600 тыс. лет. Есть неоднократные упоминания о том, что активация синтеза экзометаболических метаболитов может происходить как реакция на окислительный стресс (Hong et al., 2013). Это подтверждает предположение, что образование вторичных метаболитов дает грибам-продуцентам преимущество для выживания в экстремальных эконизах. Отсутствие или неполный состав экзометаболических метаболитов могут быть также связаны с недостаточным селекционным прессингом среды и/или с точечной мутацией в регуляторном гене (Frisvad, Larsen, 2015). Например, известно, что у некоторых штаммов вида *P. chrysogenum*, длительное время находящихся в коллекциях, отсутствует биосинтез пенициллина (Samson, Frisvad, 2004).

В данном исследовании были обнаружены экзометаболические метаболиты у видов, для которых хемотаксономические маркеры еще до конца не установлены. Так, впервые обнаружено образование андрастинов штаммом вида *P. restrictum* и показано широкое распространение ругуловазинов для вида *P. variable*.

Несмотря на некоторые ограничения, определение вторичных метаболитов, несомненно, способствует уточнению видовой идентификации пенициллов, особенно в тех случаях, когда культурально-морфологические характеристики штаммов не совсем точно соответствуют диагностическим описаниям. В настоящее время еще не для всех видов рода *Penicillium* это возможно, но с развитием баз данных по вторичным метаболитам этот метод будет использоваться значительно шире.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-29-02629-офи_м.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кочкина Г.А., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Чигинева Н.И., Василенко О.В., Спирина Е.В., Гиличинский Д.А. Разнообразие грибов деятельного слоя Антарктиды // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 236–244.
- Kochkina G.A., Ozerskaya S.M., Ivanushkina N.E., Chigineva N.I., Vasilenko O.V., Spirina E.V., Gilichinskii D.A. Fun-

- gal diversity in the Antarctic active layer // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 94–101.
- Barreto M.C., Houbraeken J., Samson R.A., Frisvad J.C. Taxonomic studies of the *Penicillium glabrum* complex and the description of new species *Penicillium subericola* // *Fungal Diversity*. 2011. V. 49. P. 23–33.
- Burdock G.A., Flamm W.G. Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid // *Int. J. Toxicol.* 2000. V. 19. P. 195–218.
- Cole R.J., Schweikert M.A. Handbook of secondary fungal metabolites. Amsterdam: Acad. Press, 2003. V. 1–3. 1925 p.
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O., Samson R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* // *Stud. Mycol.* 2004. V. 49. P. 201–241.
- Frisvad J.C., Larsen T.O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 7859–7877.
- Hong S.Y., Roze L.V., Linz J.E. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism // *Toxins (Basel)*. 2013. V. 5. P. 683–702.
- Houbraeken J., Frisvad J.C., Samson R.A. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina* // *Stud. Mycol.* 2011. V. 70. P. 53–138.
- Isaka M., Jaturapat A., Kladwang W., Punya J., Lertwerawat Y., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y. Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 1067 // *Planta Med.* 2000. V. 66. P. 473–475.
- Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. Fungi in ancient permafrost sediments of the Arctic and Antarctic regions // *Life in Ancient ice* / Eds. Cactello J., Rogers S. Proceed. Prins. Univ. Princeton: Princeton Univ. Press, 2005. Ch. 9. P. 127–139.
- Jiang C., Song J., Zhang J., Yang Q. New production process of the antifungal chaetoglobosin A using cornstalks // *Braz. J. Microbiol.* 2017. V. 48. P. 410–418.
- Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V. *Penicillium* fungi from permafrost: biosynthesis of secondary metabolites, peculiarities of growth and development // *Permafrost: Distribution, Composition, and Impact on Infrastructure and Ecosystems* / Ed. Pokrovsky O.S. New York: Nova Science Publishers, 2014. P. 265–280.
- Lowes N.R., Smith R.A., Beck B.E. Roquefortine in the stomach contents of dogs suspected of strychnine poisoning in Alberta // *Can. Vet. J.* 1992. V. 33. P. 535–538.
- Mantle P.G. Secondary Metabolites *Penicillium* and *Acremonium* // *Biotechnology Handbooks* / Eds. Atkinson T., Sherwood R.F. New York: Plenum Press, 1987. V. 1. P. 161–243.
- Matuschek M., Wallwey C., Xie X., Li S.M. New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chano-clavine-I aldehyde to agroclavine // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. P. 4328–4335.
- Miller J.D., McMullin D.R. Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 9953–9966.
- Nicoletti R., de Stefano M. *Penicillium restrictum* as an antagonist of plant pathogenic fungi // *Dinamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*. 2012. V. 6. Iss. 2. P. 61–69.
- Omura S., Inokoshi J., Uchida R., Shiomi K., Masuma R., Kawakubo T., Tanaka H., Iwai Y., Kosemurall S., Yamamura S. Andrastins A–C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929 // *J. Antibiot.* 1996. V. 49. P. 414–417.
- Ozerskaya S., Kochkina G., Ivanushkina N., Gilichinsky D. Fungi in permafrost // *Permafrost soils* / Ed. Margesin R. (Austria). Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 2008. P.85–96.
- Pitt J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphs states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press, 1979. 633 p.
- Samson R.A., Frisvad J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites // *Stud. Mycol.* 2004. V. 49. P. 1–143.
- Trost B.M., Osipov M. Recent advances on the total syntheses of the communesin alkaloids and perophoramidine // *Chemistry*. 2015. V. 21. P. 16318–16343.

Exometabolites the *Penicillium* Fungi Isolated from Various High-Latitude Ecosystems

T. V. Antipova¹, V.P. Zhelifonova¹, B. P. Baskunov¹, G. A. Kochkina¹,
S. M. Ozerskaya¹, and A. G. Kozlovskii^{1, *}

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

*e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Received March 29, 2018

Abstract—Secondary metabolites of 25 *Penicillium* strains isolated from high-latitude ecosystems (upper layer of Antarctic soils and Arctic permafrost deposits) were analyzed. Out of the studied strains, 80% were found to produce secondary metabolites belonging to benzodiazepine alkaloids (anacin, cyclopenin, and cyclopeptin), quinoline alkaloids (viridicatin and 3-methoxyviridicatin), diketopiperazine alkaloids (aurantiamine, 3,12-dihydroroquefortine, roquefortine and rugulosovin B), polycyclic indole alkaloids (communesin B and chaetoglobosin A), clavine ergot alkaloids (rugulovasins A and B, festuclavine, fumigaclavines A and B, and cyclopiazonic acid), polyketides (mycophenolic acid and citreoviridin), terpenes (andrastins A and B and phomenone), and N-acetyl-triptamine. Most strains of the *Penicillium* subgenus isolated from anthropogenically impaired upper layers of Antarctic deposits and from subsurface Arctic deposits exhibited more complete spectra of secondary metabolites compared to three strains isolated from permafrost 15000 to 600000 years old. This is the first report on andrastins formation by a *P. restrictum*. Wide occurrence of rugulovasins in *P. variable* strains was shown.

Keywords: mycelial fungi, *Penicillium*, secondary metabolites, chemotaxonomy, Antarctica, Arctic

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАРБОГИДРАЗ ЭНДОДЕПОЛИМЕРАЗНОГО ДЕЙСТВИЯ В ШТАММЕ *TRICHODERMA REESEI* С ПОМОЩЬЮ МУТАГЕНЕЗА

© 2018 г. Е. В. Костылева^{а, *}, Н. В. Цурикова^а, А. С. Серeda^а, И. А. Великорецкая^а, Т. Н. Веселкина^а, Н. С. Лобанов^б, И. А. Шашков^с, А. П. Сеницын^{с, д}

^аВсероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) – филиал ФГБУН “ФИЦ питания и биотехнологии”, Москва, Россия

^бНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

^сФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

^дФГБОУ ВПО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Поступила в редакцию 02.04.2018 г.

С целью получения ферментных препаратов кормового назначения с увеличенной активностью карбогидраз эндодеполимеразного действия проведен мутагенез штамма *Trichoderma reesei* с использованием ультрафиолетового и ионизирующего облучения. Проведение УФ-мутагенеза в дробном режиме позволило увеличить активность эндоглюканазы на 20%, ксиланазы – на 80% по отношению к исходному штамму. Наибольший эффект был достигнут после проведения многостадийного гамма-мутагенеза на кобальтовом источнике. Активность эндоглюканазы при культивировании в колбах была увеличена в пять раз, а ксиланазы более чем в восемь раз по отношению к исходному продуценту. Высокая активность целевых ферментов мутантных штаммов подтвердилась при культивировании в лабораторных ферментерах с подпиткой лактозой в качестве источника углерода и индуктора биосинтеза целлюлаз и ксиланаз. Максимальная активность эндоглюканазы и ксиланазы была достигнута при культивировании штамма *T. reesei*-Co-44, полученного в результате гамма-мутагенеза, и составила 1324.2 ± 70.1 и 3394 ± 164 ед./мл соответственно. Данный уровень активности позволяет производить конкурентоспособные ферментные препараты карбогидраз кормового назначения.

Ключевые слова: *Trichoderma reesei*, эндоглюканаза, ксиланаза, мутагенез, ферментные препараты.

DOI: 10.1134/S0026365618050130

Грибы рода *Trichoderma* традиционно используются в качестве продуцентов целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов для текстильной, целлюлозно-бумажной, спиртовой и других отраслей промышленности (Wang et al., 2013). Штаммы *T. reesei* отличаются способностью к продукции сбалансированного комплекса целлюлаз, обеспечивающего конверсию целлюлозы в сбраживаемые сахара, что важно для реализации технологии получения биоэтанола. Именно поэтому целью большинства проведенных ранее исследований по повышению продуктивности штаммов *Trichoderma* являлось увеличение биосинтеза всех ферментов целлюлолитического комплекса, включая экзо- и эндодеполимеразы (Wang et al., 2011, Peterson, Nevalainen, 2012).

В последнее время получило развитие другое направление применения целлюлаз и гемицел-

люлаз – их широкое использование в сельском хозяйстве в качестве кормовых добавок для повышения питательной ценности кормов для сельскохозяйственных животных и птицы (Bedford, 2010, Сеницын и соавт., 2016). Основу большинства кормовых рационов составляют злаковые культуры с высоким содержанием некрахмальных полисахаридов (НКП), которые оказывают антипитательное действие на пищеварительную систему моногастричных животных и птицы, снижая питательную ценность кормов. Включение карбогидраз, эффективно гидролизующих НКП, в рационы на основе зерновых культур приводит к снижению вязкости перевариваемой массы, повышает доступность питательных компонентов для действия пищеварительных ферментов, способствует нормализации микрофлоры кишечника, увеличивает энергетическую цен-

ность и усваиваемость кормов (Bedford, 2000, Khattak, 2006). При этом ключевыми компонентами в препаратах карбогидраз для кормового применения являются эндодеполимеразы (Синицын и соавт., 2016) – эндоглюканазы и эндоксилазазы. Эндоглюканаза (эндо- β -1,4-глюканаза, КМЦаза, КФ 3.2.1.4) гидролизует внутренние β -1,4-гликозидные связи, удаленные от концов полимерной цепи целлюлозы и β -1,4(1,3)-глюканов (Bedford, 2010, Sajith et al., 2016, Walia et al., 2017), что приводит к снижению степени полимеризации этих полисахаридов и снижению вязкости их водных растворов. Ксиланаза (эндо-1,4- β -ксиланаза, КФ 3.2.1.8) является ключевым ферментом в гидролизе ксиланов злаковых культур. Ксиланаза приводит не только к уменьшению степени полимеризации ксиланов и уменьшению их вязкости, но и к образованию ксилоолигосахаридов, обладающих пребиотическими свойствами субстрата (Pozizeli et al., 2005, Oliveira et al., 2014, Walia et al., 2017).

В составе внеклеточного ферментного комплекса *T. reesei* преобладают экзо-деполимеразы – целлобиогидролазы (ЦБГ). Доля ЦБГ составляет около 60% от всех целлюлаз *T. reesei*, ЦБГП – 20–25%, на долю эндоглюканаз приходится около 15–20% (Miettinen-Oinonen, 2004, Bedford, 2010, Gusakov, 2011). Содержание гемицеллюлаз примерно в два раза ниже, чем целлюлаз (Adav et al., 2012); помимо ксиланаз, основными компонентами гемицеллюлазного комплекса являются β -ксилозидаза, β -маннаназа и арабинофуранозидаза (Ali et al., 2014).

Учитывая, что целлюлазы и гемицеллюлазы являются востребованными ферментами, актуально проведение исследований, направленных на снижение себестоимости получаемых ферментных препаратов (ФП) за счет повышения продуктивности штаммов, а также на изменение соотношения основных компонентов карбогидразного комплекса с целью максимально эффективного использования ФП в различных технологических процессах, в зависимости от вида сырья и характеристик конечного продукта. Отметим, что для применения в качестве кормовой добавки целесообразно получать ФП с увеличенным содержанием ксиланаз и эндоглюканаз. Поэтому целью данной работы являлось повышение уровня биосинтеза ксиланазы и эндоглюканазы в промышленном штамме *T. reesei* с использованием мутагенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм микроорганизма. В качестве исходного использовали штамм *T. reesei* ВСМ 18.2/КК (ВГНКИ28) – промышленный продуцент целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов (Патент РФ 2001949, С 12 N 9/42, 1993 г.).

Глубинное культивирование в колбах. Продукты выращивали на термостатируемых качалках (250 об./мин) при 30°C в течение 120 ч в колбах объемом 750 мл с 50 мл ферментационной среды (ФС) следующего состава (%): лактоза – 2.0, аморфная целлюлоза – 1.0, солодовые ростки – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, KH_2PO_4 – 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.6, CaCl_2 – 0.06, водопроводная вода; pH доводили до 4.8–5.0, используя 10% раствор ортофосфорной кислоты. Стерильные питательные среды засеивали микробиологической петлей, используя в качестве инокулята культуру, выращенную на агаризованной среде № 1 (см. далее). Биомассу культуры, выращенной глубинно, отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин. Культуральную жидкость (КЖ) использовали для определения активности целевых ферментов.

Глубинное культивирование в ферментерах исходного и мутантных штаммов *T. reesei* проводили в лабораторных ферментерах КФ 104/3 с геометрическим объемом 3 л и рабочим объемом 1.35 л, оснащенных системами автоматического регулирования pH, pO_2 и температуры, а также барботерами для подачи воздуха и двухъярусной мешалкой. Инокулят для засева ферментеров получали культивированием гриба в качалочных колбах (250 об./мин) при 30°C в течение 48 ч в среде следующего состава (%): глюкоза – 2.5, кукурузный экстракт (40% СВ) – 2, KH_2PO_4 – 0.5, водопроводная вода. Доза засева ферментеров инокулятом – 8%. Ферментацию проводили в течение 120 ч на среде следующего состава (%): лактоза – 2.0, аморфная целлюлоза – 1.0, солодовые ростки – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, KH_2PO_4 – 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.6, CaCl_2 – 0.06, пеногаситель Пропинол – 0.1, водопроводная вода; pH поддерживали на уровне 5.5. Ферментацию проводили при 30°C, при аэрации 1 объем воздуха на 1 объем среды в мин, поддерживая pO_2 выше 30% за счет скорости перемешивания. Подпитку субстратами проводили в непрерывном режиме в течение 100 ч 30% водным раствором лактозы и ксилозы в соотношении 5 : 1. Объем подпитки – 0.5 л. Биомассу культуры, выращенной глубинно, отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин. КЖ использовали для определения активности целевых ферментов.

Подготовка посевного материала. Для получения посевного материала использовали агаризованную среду № 1 (модифицированная среда SM) следующего состава (%): KH_2PO_4 – 0.2, глюкоза – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.4, пептон – 0.6, солодовое сушло – 2.0, агар-агар – 2.0. Для посева облучен-

ных спор использовали среду № 2 (%): KH_2PO_4 – 0.2, дрожжевой экстракт – 0.4, пептон – 0.6, аморфная целлюлоза – 1.0, Тритон (ограничитель роста) – 0.1, агар-агар – 2.0.

Получение споровых суспензий. Штамм выращивали на агаризованной среде № 1 в течение 7 сут при 30°C и 7 сут при комнатной температуре на свету. Споры смывали с агара 0.1%-ным раствором Твина-80 и стерильно фильтровали через стеклянный фильтр для получения гомогенной суспензии.

Мутагенез проводили в соответствии со следующей схемой: приготовление споровых суспензий → мутагенная обработка → рассев облученных суспензий на селективную среду № 2 → морфологическая оценка выросших колоний → → пересев отобранных клонов на агаризованную среду № 1 → проверка активности отобранных клонов при глубинном культивировании в колбах в среде ФС → пересев наиболее активных клонов на агаризованную среду № 1 → повторная проверка активности при глубинном культивировании в колбах в среде ФС. После посева на среду № 1 клоны выращивали 7 сут при 30°C, инкубировали в течение 7 сут при 22°C на свету, далее хранили при 4°C.

Условия мутагенной обработки. Для УФ-облучения использовали ультрафиолетовую камеру УФК-3, длина волны 254 нм, мощность излучения 30 Вт, расстояние от облучателя до объекта 15 см.

Гамма-мутагенез проводили на гамма-установке камерного типа ГУТ-200 с радиоактивным источником кобальт-60 М. Дозы облучения исследуемых образцов измеряли стеклянными дозиметрами СГД-8, учитывая, что мощность облучения соответствует дозе облучения в единицу времени. Облучение проводили при 20–22°C.

Определение численности жизнеспособных клеток (спор) после мутагенного воздействия. Обработанные мутагеном споровые суспензии рассевали на агаризованную среду № 2, культивировали при 30°C в течение 7 сут, далее при комнатной температуре на свету 7 сут, ежедневно наблюдая за характером роста и морфологией колоний. Аналогичным образом проводили рассев контрольных, не подвергавшихся облучению, споровых суспензий. Отбор вариантов проводили путем “перекалывания” выбранных клонов на чашки Петри с агаризованной средой № 1. Отобранные клоны выращивали при 30°C в течение 7 сут и затем при 20°C на свету 7 сут. Проверку активности отобранных клонов осуществляли при их глубинном культивировании в колбах в среде ФС. Наиболее активные варианты пересеивали на агаризованную

среду № 1 и затем повторно тестировали активность ксиланазы и эндоглюканызы при глубинном культивировании в колбах. Варианты, в которых высокая продуктивность ферментов подтвердилась при повторной проверке, отбирали для дальнейшей селекции. Стабильность отобранных клонов проверяли при не менее чем пяти последовательных пересевах на агаризованной среде. Пересевы осуществляли через 1.5 мес. хранения.

Сухой ферментный препарат (ФП) получали с помощью лабораторной распылительной сушилки Vuchi Mini Spray Dryer B-290. Скорость подачи КЖ в распылительную головку составляла 20 мл/мин. Входная температура – 135°C, выходящая 54°C. Степень аспирации – 75%.

Активность ксиланазы и эндоглюканызы определяли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) при гидролизе ксилана из древесины березы и Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) соответственно. ВС определяли по методу Шомоди–Нельсона. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль ВС за 1 мин при 50°C, pH 5.0 и концентрации соответствующих субстратов в реакционной смеси 1% (Синицын, 1995).

Электрофорез белков ФП в ПААГ в денатурирующих условиях проводили в 12% ПААГ (25 мМ трис-глициновый буфер, pH 8.3, с ДДС-Na в концентрации 1 мг/мл) в ячейке для электрофореза Mini Protein Cell system (“Bio-Rad”, США). Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим G-250 (“Amresco”, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTIKA.10 с помощью однофакторного дисперсионного анализа и методом апостериорного анализа по критерию Тьюки при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По литературным данным, для улучшения характеристик штаммов *Trichoderma* – продуцентов целлюлаз, успешно применяют методы направленного индуцированного мутагенеза: облучение ультрафиолетом, рентгеновскими лучами, ионизирующим излучением с использованием ускорителя линейных частиц, обработка нитрозогуанидином (Peterson, Nevalainen, 2012).

УФ-мутагенез *T. reesei*. УФ-мутагенез доступен для большинства исследовательских лабораторий, поэтому часто является предпочтительным методом повышения биосинтетической активности микроорганизмов. Недостатком метода является невысокая проникающая способность УФ-лу-

Таблица 1. Результаты гамма-мутагенеза штамма *T. reesei* УФ-12

Режим облучения	Выживаемость, %	Количество +вариантов, %*		Максимальное увеличение активности, %	
		по КМЦ	по ксиланазе	по КМЦ	по ксиланазе
Сеанс I. Облучаемый штамм <i>T. reesei</i> УФ-12					
1000 Гр за 8 ч	0.92	17	11	16	28
1500 Гр за 8 ч	0.10	5	3	15	24
2000 Гр за 8 ч	0.01	29	34	69	110
Сеанс II. Облучаемый штамм – <i>T. reesei</i> -12-138					
2000 Гр за 8 ч	0.018	21	26	23	36
2250 Гр за 8 ч	0.0011	14	17	36	41
2500 Гр за 8 ч	0.00019	12	18	47	58
Сеанс III. Облучаемый штамм – <i>T. reesei</i> -12-138-6					
2500 Гр за 8 ч	0.00051	12	11	31	33
2500 Гр за 6 ч	0.00014	7	9	43	40
2500 Гр за 4 ч	0.00003	4	9	24	36
Сеанс IV. Облучаемый штамм – <i>T. reesei</i> -12-138-6-18					
2500 Гр за 6 ч	0.0008	3	6	15	14
2250 Гр за 4 ч	0.0006	15	14	17	18
2000 Гр за 4 ч	0.0011	10	7	23	21

* +варианты – клоны с увеличением активности соответствующих ферментов более чем на 10% по отношению к контролю (необлученная споровая суспензия).

чей, часто не обеспечивающая достаточного снижения выживаемости для селекции вариантов, содержащих мутации, приводящие к увеличению продуктивности штаммов (Pathak, 2015). Эффективность УФ-обработки можно повысить подбором условий и схем облучения микробных продуцентов (Костылева и соавт., 2017).

С целью увеличения продуктивности штамма *T. reesei* ВСМ 18.2/КК был проведен ряд экспериментов с использованием УФ-мутагенеза. Уровень активности ксиланазы и эндоглюканазы исходного

штамма *T. reesei* ВСМ 18.2/КК при культивировании в качалочных колбах составлял 45–55 ед./мл (табл. 2).

На первом этапе исследований была определена зависимость выживаемости спор *T. reesei* (число КОЕ) от продолжительности УФ-облучения споровых суспензий при кратковременной – до 6 мин (рис. 1а) и длительной – до 60 мин обработке ультрафиолетом (рис. 1б).

Оказалось, что вне зависимости от длительности УФ-обработки минимальная выживаемость

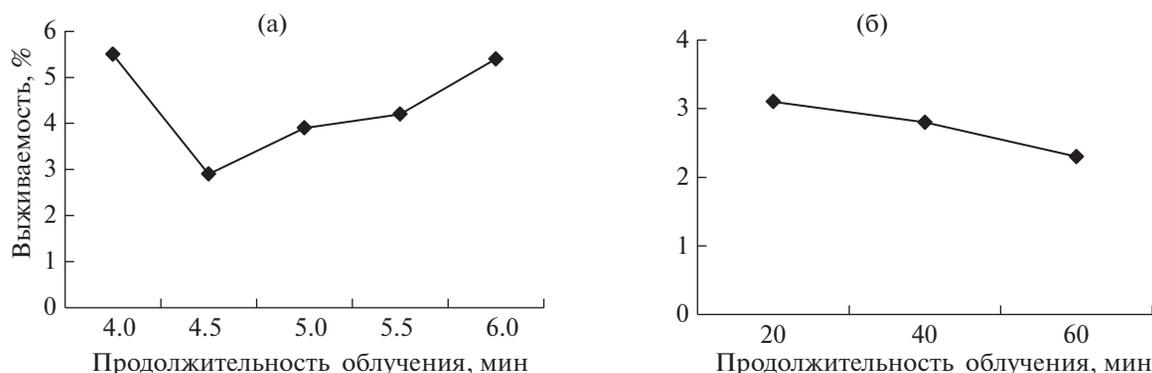


Рис. 1. Выживаемость спор штамма *T. reesei* при различных режимах кратковременного (а) и длительного (б) УФ-облучения.

спор продуцента была достаточно высока, практически одинакова и составляла 2.3–2.9%. Активность целевых ферментов у отобранных по физиолого-морфологическим признакам (скорость роста, диаметр колонии) клонов превышала активность исходного штамма при культивировании в качалочных колбах не более чем на 10–15%, что свидетельствует о недостаточной эффективности использованных режимов мутагенеза. Отсутствие заметного снижения выживаемости при длительном облучении и увеличение выживаемости при УФ-обработке в течение 5–6 мин по сравнению с 4.5 мин, очевидно, можно объяснить эффектом фоторепарации – восстановления поврежденной ДНК под действием светозависимого фермента фотолиазы (Rastogi et al., 2010).

Для устранения эффекта фоторепарации был использован метод “дробного” УФ-мутагенеза, разработанный ранее для грибов рода *Aspergillus* и заключающийся в чередовании облучения в течение 4.5 мин и релаксации в течение 30 мин при инкубировании спор в темноте (Костылева и соавт., 2017). Кратность облучения, т.е. количество сеансов УФ-облучения с последующим выдерживанием в темноте, составляла от 2 до 9 раз. Применение “дробного” режима существенно повысило эффективность УФ-мутагенеза, о чем свидетельствует значительное снижение выживаемости облученных клеток до 0.12–0.96%. (рис. 2). Мутагенез при пятикратном “дробном” облучении, обеспечившем наибольшее снижение выживаемости (до 0.12%), позволил отобрать мутантные варианты УФ-12 и УФ-45 с существенно увеличенным уровнем активности ксиланазы по сравнению с исходным штаммом – в 1.8 и 1.6 раз соответственно, и заметным повышением активности эндоглюканазы – на 18 и 25% соответственно (рис. 3).

Электрофоретический анализ КЖ, полученной на основе исходного и мутантных штаммов (рис. 4), показал появление в образцах КЖ мутантных штаммов выраженной полосы на уровне 21 кДа, соответствующий ксиланазе II (XYLII) *T. reesei*, и более интенсивной по сравнению с контрольным штаммом полосы на уровне 48 кДа, соответствующей эндоглюканазе II (EGII) *T. reesei* (Herpoël-Gimbert et al., 2008), что подтверждает увеличение биосинтеза данных ферментов в новых полученных мутантах.

Уровень активности целевых ферментов в отобранных мутантных клонах не снижался после трех пассажей на агаризованной среде № 1, что свидетельствует о стабильности мутантных штаммов.

Повторный УФ-мутагенез мутантов первого поколения – *T. reesei* УФ-12 и УФ-45, не привел к дальнейшему повышению активности целевых ферментов. Кроме того, было отмечено повышение устойчивости мутантов к воздействию УФ-лучей:

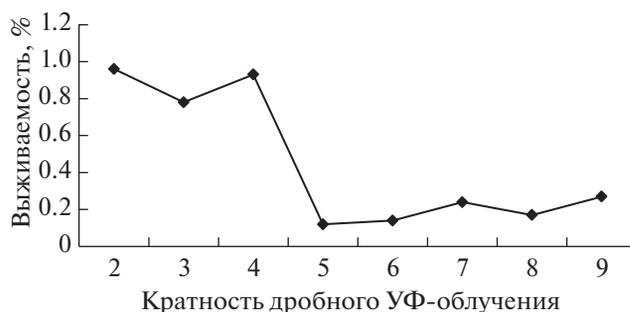


Рис. 2. Выживаемость спор штамма *T. reesei* после “дробного” УФ-мутагенеза.

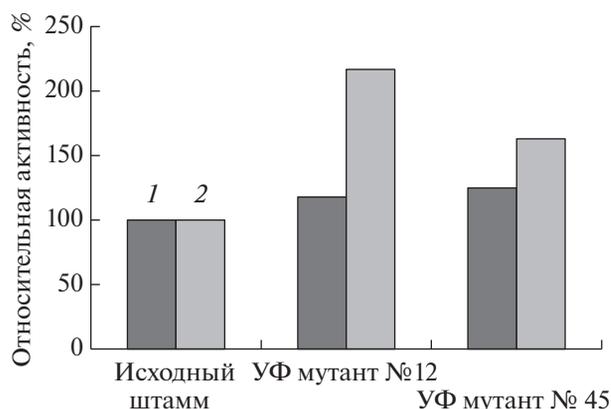


Рис. 3. Уровень активности ксиланазы (1) и эндоглюканазы (2) в исходном и мутантных штаммах *T. reesei*.

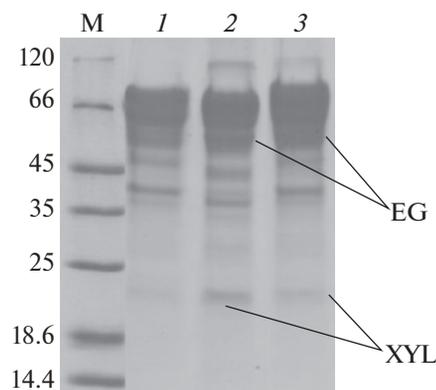


Рис. 4. Электрофореграмма фильтратов КЖ исходного штамма *T. reesei* (1) и полученных УФ-мутантных штаммов: *T. reesei* УФ-12 (2), *T. reesei* УФ-45 (3).

выживаемость спорных суспензий при 5–7-кратном УФ-облучении составила 2.9–4.1%.

Гамма-мутагенез *T. reesei*. Ионизирующее излучение, к которому относятся гамма-лучи, имеет ряд преимуществ перед другими видами мутагенов. Оно обладает сильным проникающим дей-

ствием и способностью индуцировать мутации, устойчивые к репарации, в том числе, кластерные разрывы ДНК, способствуя образованию свободных радикалов (Ottenheim et al., 2015), в связи с чем гамма-мутагенез широко используется в биотехнологии для изменения характеристик растительных и микробных культур (Ottenheim et al., 2015, Vardhan, Shukla, 2017).

Для проведения гамма-облучения на кобальтовом источнике в качестве исходного штамма был выбран УФ-мутант *T. reesei* УФ-12 с уровнем активности эндоглюканазы (КМЦазы) 55–65 ед./мл, ксиланазы 80 – 100 ед./мл.

В первом блоке исследований было установлено, что наибольшую эффективность обеспечивала доза облучения 2000 Гр в течение 8 ч, при которой наблюдали максимальное снижение выживаемости спор штамма – до 0.01% (табл. 1). По сравнению с более “мягкими” режимами мутагенеза увеличилась частота появления +вариантов, а также вырос уровень активности целевых ферментов в наиболее продуктивных клонах. Отобранные при данном режиме наиболее продуктивные клоны при глубинном культивировании характеризовались различным соотношением ксиланазной и эндоглюканазной активностей, но, как правило, мутанты с увеличенной ксиланазной активностью имели повышенную эндоглюканазную активность. Это можно объяснить тем, что биосинтез основных гликозилгидролаз *T. reesei* скоординирован, так как экспрессия генов целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов регулируется одними и теми же активаторами (XYR1, ACE2, HAP2/3/5) и репрессорами (CRE1 и ACE1) (Seidl, Seiboth, 2010, Portnoy, 2011, Amore, 2013, Hassan 2017). Такой эффект наблюдался, например, при получении мутантного штамма *T. reesei* RUT-C30 из исходного *T. reesei* QM6a с использованием УФ-мутагенеза и мутагенеза нитрозогуанидином (Peterson, Nevalainen, 2012).

В результате проведения первого этапа гамма-мутагенеза был получен мутант второго поколения – штамм *T. reesei* 12-138 с уровнем активности эндоглюканазы (КМЦазы) 90–105 ед./мл, ксиланазы – 170–190 ед./мл (табл. 2). Мутантный штамм сохранял высокий уровень активности целевых ферментов после трех пересевов на агаризованной среде № 1 и был выбран в качестве исходного для проведения повторного гамма-облучения.

Учитывая, что на первом этапе гамма-мутагенеза наиболее “жесткий” из использованных режимов облучения обеспечил появление максимального количества +вариантов и позволил отобрать стабильный, высокопродуктивный штамм, следующий этап мутагенеза проводили при дозах облучения 2000–2500 Гр в течение 8 ч (табл. 1).

Повышение дозы гамма-облучения обусловило существенное снижение выживаемости спор продуцента. При этом количество вариантов с заметным повышением активности эндоглюканазы и ксиланазы уменьшилось по сравнению с облучением при 2000 Гр, в то же время наиболее жесткий режим (2500 Гр) способствовал появлению вариантов с максимальным уровнем активности целевых ферментов. При данном режиме облучения был отобран мутантный штамм *T. reesei* 12-138-6 с уровнем активности КМЦазы 140–150 ед./мл, ксиланазы – 260–270 ед./мл (табл. 2). Штамм *T. reesei* 12-138-6 сохранял уровень активности целевых ферментов после трех последовательных пересевов на агаризованной среде № 1.

В литературных источниках большинство данных по мутагенезу продуцентов ферментов получено при выживаемости продуцентов более 0.01% (Herpoël-Gimbert et al., 2008, Shafique et al., 2010, Du et al., 2015, Darabzadeh et al., 2018), сведения об успешном проведении мутагенеза при низкой выживаемости встречаются редко (Ottenheim et al., 2015). Однако полученные нами результаты свидетельствовали о перспективности применения “жестких” режимов гамма-облучения. В связи с этим, на следующем этапе мощность облучения была увеличена за счет сокращения времени мутагенной обработки, и облучаемые суспензии получали дозу 2500 Гр за более короткое время – 4 и 6 ч (табл. 1).

Наибольшее увеличение активности целевых ферментов было получено при режиме облучения 2500 Гр за 6 ч (6.9 Гр/мин). Дальнейшее повышение мощности облучения до 2500 Гр в течение 4 ч (10.4 Гр/мин) не привело к увеличению эффективности мутагенеза. Частота появления вариантов с повышенным уровнем синтеза целевых ферментов была существенно ниже, чем в предыдущих опытах. Для проведения дальнейших экспериментов был выбран штамм *T. reesei*-12-138-6-18 с уровнем активности КМЦазы 200–220 ед./мл, ксиланазы – 350–370 ед./мл, полученный при режиме облучения 2500 Гр за 6 ч (табл. 2).

Наибольшую эффективность мутагенеза обеспечивает соблюдение баланса между летальными повреждениями ДНК и частотой положительных мутаций (Ottenheim et al., 2015). Из результатов данных второго и третьего сеансов гамма-облучения очевидно, что дальнейшее повышение дозы облучения или увеличение мощности за счет сокращения времени облучения было нецелесообразно из-за слишком значительного снижения выживаемости (табл. 1). Появлению наиболее продуктивных мутантов способствовало облучение при режимах, обеспечивающих выживаемость спор в диапазоне 0.0001–0.001%. Режимы для следующего сеанса облучения были выбраны с учетом данного вывода.

Таблица 2. Повышение активности ксиланазы и эндоглюканазы *T. reesei* на различных этапах мутагенеза

Мутагенез	Штамм	Эндоглюканаза (по КМЦ)			Ксиланазы		
		ед./мл*	% к контр.	к исх. штамму	ед./мл*	% к контр.	к исх. штамму
—	<i>T. reesei</i> ВСМ 18.2/КК (Исходный)	49 ± 8	100	100	48 ± 8	100	100
УФ-мутагенез	<i>T. reesei</i> УФ-12	61 ± 9	125	В 1.2 раз	92 ± 11	192	В 1.9 раз
I сеанс γ -мутагенеза 2000 Гр 8 ч	<i>T. reesei</i> 12-138	99 ± 9	162	В 2 раза	181 ± 12	197	В 3.8 раз
II сеанс γ -мутагенеза 2500 Гр 8 ч	<i>T. reesei</i> 12-138-6	147 ± 10	148	В 3 раза	266 ± 13	147	В 5.5 раз
III сеанс γ -мутагенеза 2500 Гр 6 ч	<i>T. reesei</i> 12-138-6-18	211 ± 12	145	В 4.3 раза	360 ± 18	135	В 7.5 раз
IV сеанс γ -мутагенеза 2000 Гр 4 ч	<i>T. reesei</i> -12-138-6-18-44 (<i>T. reesei</i> -Co-44)	249 ± 14	118	В 5 раз	431 ± 15	120	В 9 раз

* Значения представлены в виде средних \pm стандартное отклонение. Согласно результатам дисперсионного анализа полученные данные статистически различны при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

Четвертый сеанс гамма-облучения штамма *T. reesei*-12-138-6-18, выбранного в качестве исходного, позволил повысить активность мутантов на 15–20% по КМЦазе и 20% по ксиланазе. В итоге был отобран штамм *T. reesei*-12-138-6-18-44 (*T. reesei*-Co-44) с уровнем активности КМЦазы 240–260 ед./мл, ксиланазы — 420–440 ед./мл (табл. 2), сохранявший эту активность при пяти пересевах.

Таким образом, в результате многостадийного мутагенеза с использованием УФ- и гамма-облучения активность эндоглюканазы и ксиланазы штамма *T. reesei* ВСМ 18.2/КК при культивировании в качалочных колбах была увеличена в пять и девять раз соответственно (табл. 2).

Все полученные мутантные штаммы сохраняли высокий уровень активности после как минимум пяти пересевов на агаризованной среде № 1. На рис. 5 приведены данные по стабильности уровня биосинтеза целевых ферментов штаммами *T. reesei* УФ-12 и *T. reesei*-Co-44.

Мутантные штаммы отличались от исходного не только повышенной способностью к биосинтезу целевых ферментов, но также морфологическими признаками при выращивании на агаризованной среде № 1 (рис. 6). УФ-мутант характеризовался более выраженным воздушным мицелием, темными спорами и более компактным ростом по сравнению с исходным штаммом. Гигантские колонии штамма *T. reesei*-Co-44, полученного после гамма-облучения, были более компактны по сравнению с исходным штаммом и УФ-мутантом и отличались ровными краями и ярко-желтой пигментацией в центре колонии.

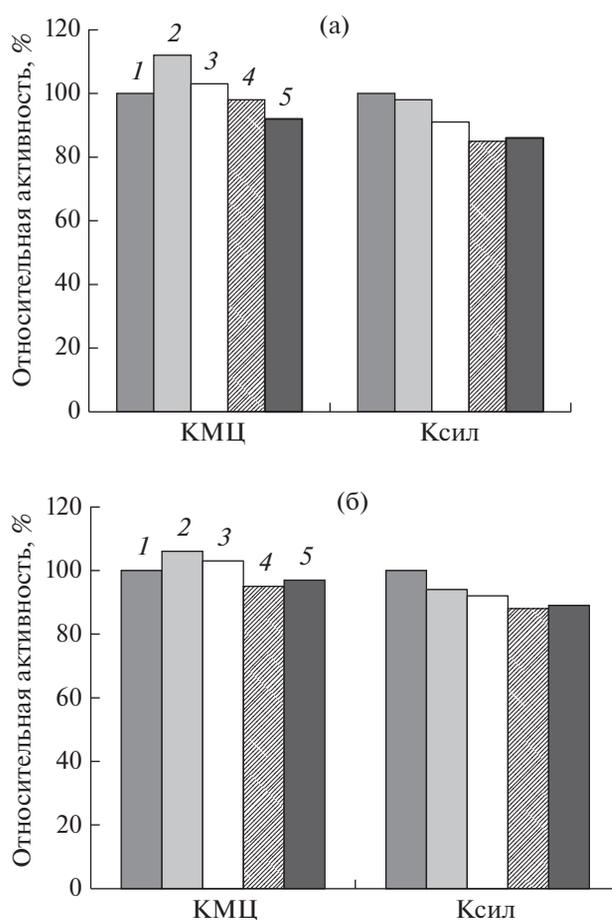


Рис. 5. Стабильность уровня продукции целевых ферментов полученными мутантными штаммами *T. reesei* УФ-12 (а) и *T. reesei*-Co-44 (б) при пяти последовательных пересевах (1, 2, 3, 4, 5) на агаризованную среду № 1.

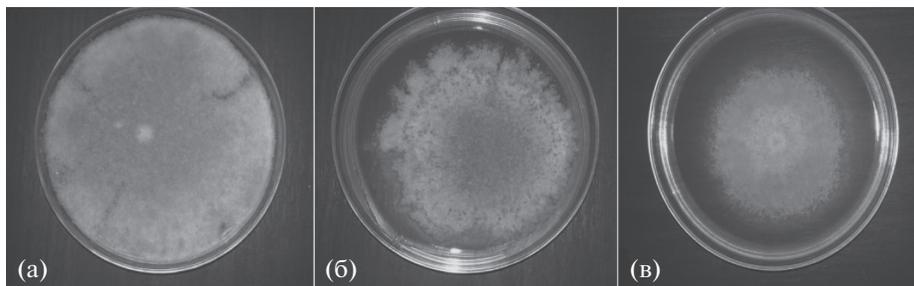


Рис. 6. Гигантские колонии штаммов *T. reesei* ВСМ 18.2/КК (а), *T. reesei* УФ-12 (б) и *T. reesei*-Со-44 (в) на агаризованной среде № 1 на 96 ч роста.

Известно, что на продуктивность *T. reesei*, как и других продуцентов ферментов, влияет внесение в среды индукторов их биосинтеза, а потенциал активных продуцентов в наибольшей степени реализуется при культивировании в ферментерах в режиме с подпиткой углеводами, индуцирующими биосинтез карбогидраз (Portnoy, 2010). Поэтому были проведены ферментации полученных му-

тантных штаммов *T. reesei* УФ-12 и *T. reesei*-Со-44 в лабораторных ферментерах с рабочим объемом 1.35 л в режиме с подпиткой лактозой и ксилозой в соотношении 5 : 1 в качестве индукторов биосинтеза целлюлаз и ксиланаз.

В течение 24–48 ч процесса ферментации наблюдалось активное накопление биомассы продуцентов. Подпитку углеводами начинали после 24 ч культивирования, в это же время начинался и биосинтез целевых ферментов. С 48 до 120 ч процесса наблюдалось активное увеличение в КЖ активности целевых ферментов. Прирост активности эндоглюканазы у исходного штамма и УФ-мутанта замедлялся после 72 ч культивирования (рис. 7). Накопление ксиланазы у всех штаммов замедлялось после 96 ч ферментации. Ферментация в лабораторных ферментерах позволила получить в культуральной жидкости штамма *T. reesei*-Со-44 активность эндоглюканазы 1324.2 ± 70.1 ед./мл, что в 2.3 и 1.7 раз превышает эндоглюканазную активность исходного штамма и УФ-мутанта соответственно. Активность ксиланазы в КЖ кобальтового мутанта достигла 3394 ± 164 ед./мл, что в четыре раза превышает ксиланазную активность исходного штамма и в 2.6 раз активность УФ-мутанта.

Активность ксиланазы и эндоглюканазы штамма *T. reesei*-Со-44, полученного с применением гамма-мутагенеза, существенно превосходила активность исходного штамма *T. reesei* ВСМ 18.2/КК и мутанта первого поколения *T. reesei* УФ-12 (рис. 7). Кроме того, биосинтез ферментов штаммом *T. reesei*-Со-44 начинался почти на сутки раньше. Об ускорении динамики роста свидетельствует более быстрое развитие мицелия мутантного штамма, полученного в результате ионизирующего облучения (рис. 8). Мицелий штамма *T. reesei*-Со-44 также характеризовался большей толщиной гиф по сравнению с исходным штаммом и УФ-мутантом, наличием утолщений и жировых включений. УФ-мутант практически не отличался по морфологическим признакам от исходного штамма. Можно отметить

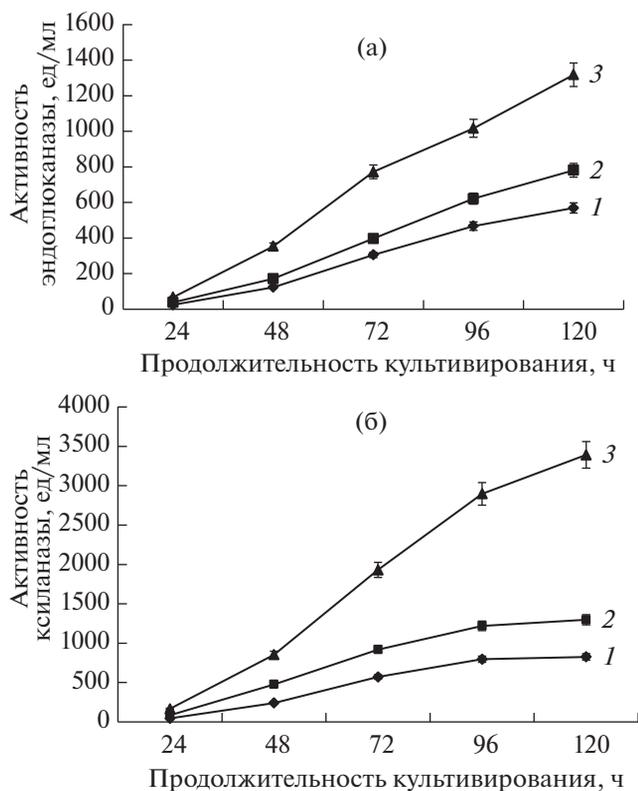


Рис. 7. Динамика накопления эндоглюканазы (а) и ксиланазы (б) исходным (1 – ВСМ 18.2/КК) и мутантными (2 – УФ-12; 3 – Со-44) штаммами в процессе культивирования в лабораторных ферментерах в режиме с подпиткой.

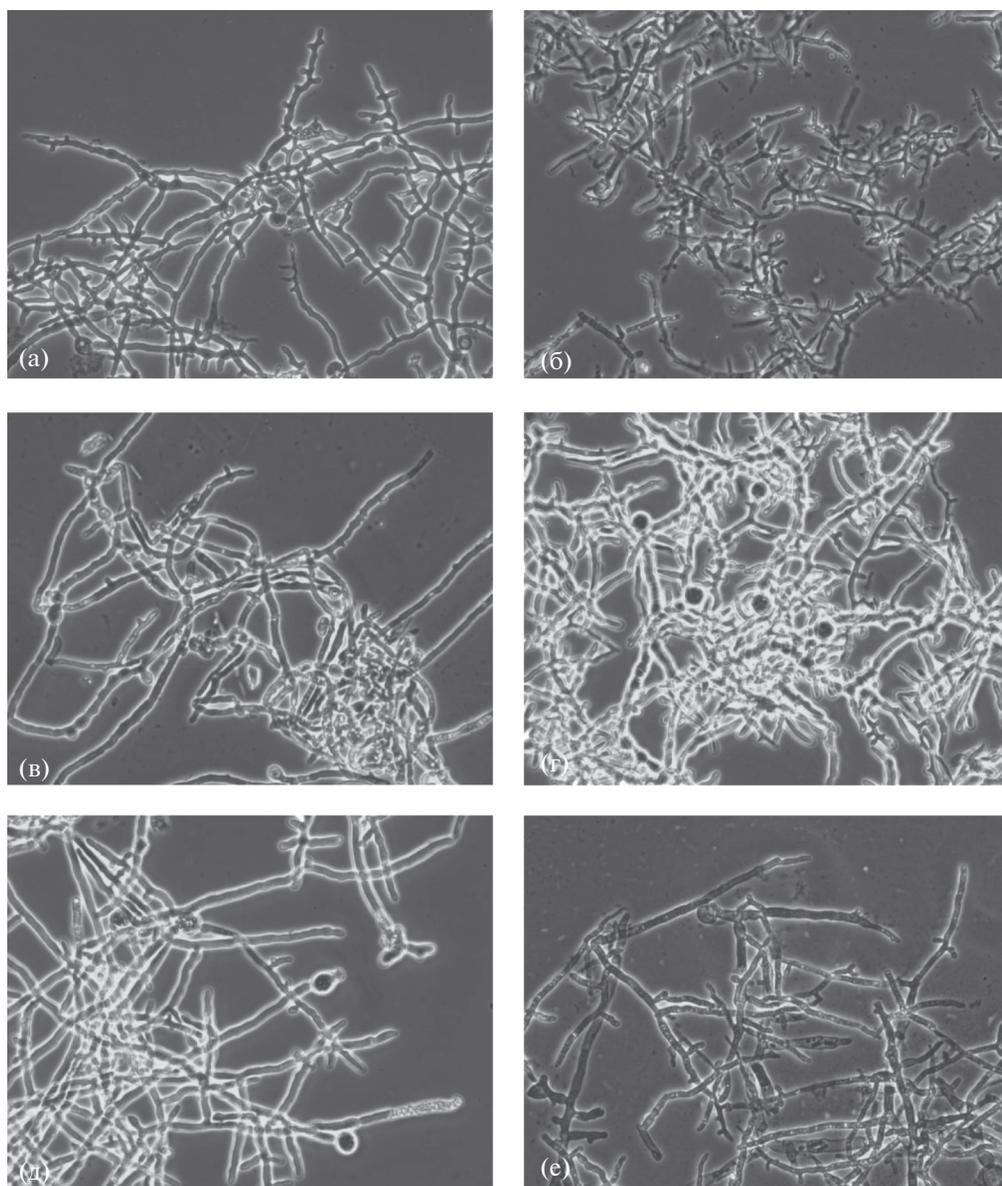


Рис. 8. Мицелий штаммов *T. reesei* при росте на среде № 1 без агара: *T. reesei* BSM 18.2/КК – 24 ч роста (а), 48 ч роста (б); *T. reesei* УФ-12 – 24 ч роста (в), 48 ч роста (г); *T. reesei*-Co-44 – 24 ч роста (д), 48 ч роста (е).

лишь несколько меньшую разветвленность мицелия у УФ-мутанта.

Таким образом, в результате многоступенчатого мутагенеза получен высокоактивный штамм *T. reesei*-Co-44 с увеличенной продукцией ксиланазы – в девять раз и эндоглюканазы (КМЦазы) – в пять раз при культивировании в качалочных колбах по сравнению с исходным штаммом *T. reesei* BSM 18.2/КК. Культивирование мутантного штамма *T. reesei*-Co-44 в ферментерах с углеводной подпиткой позволило повысить активность эндоглюканазы до 1324.2 ± 70.1 ед./мл, ксиланазы – до 3394 ± 164 ед./мл. Полученные данные позволяют заключить, что ис-

пользование мутантных штаммов *T. reesei* может обеспечить производство высокоактивных конкурентоспособных ферментных препаратов кормового назначения с увеличенным содержанием ферментов эндополимераз, предназначенных для разрушения НКП (ксиланов, целлюлозы и β -глюканов).

Научно-исследовательская работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 0529-2016-0045), а также с использованием научного оборудования ЦКП

“Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Костылева Е.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Бурцева Э.И., Веселкина Т.Н., Нефедова Л.И., Шариков А.Ю., Цурикова Н.В., Лобанов Н.С., Сеницын А.П.* Разработка схем индуцированного мутагенеза для повышения продуктивности штаммов рода *Aspergillus* – продуцентов амилолитических ферментов // *Микробиология*. 2017. Т. 86. № 4. С. 483–493.
- Kostyleva E.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Burtseva E.I., Veselkina T.N., Nefedova L.I., Sharikov A.Y., Tsurikova N.V., Lobanov N.S., Sinityn A.P.* Development of schemes of induced mutagenesis for improving the productivity of *Aspergillus* strains producing amylolytic enzymes // *Microbiology (Moscow)*. 2017. V. 86. P. 493–502.
- Сеницын А.П., Сеницына О.А., Короткова О.Г.* Ферментные новшества // *Агробизнес*. 2016. Т. 38. № 4. С. 88–92.
- Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А.* Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М: МГУ, 1995. 144 с.
- Adav S.S., Chao L.T., Sze S.K.* Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012. V. 11. № 7. M111.012419. doi 10.1074/mcp.M111.012419
- Ali N., Athar M., Khan Y., Idrees M., Ahmad D.* Regulation and improvement of cellulase production: Recent Advances // *Natural Resources*. 2014. V. 5. P. 857–863. doi 10.4236/nr.2014.514073
- Amore A., Giacobbe S., Faraco V.* Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi // *Curr. Genom.* 2013. V. 14. P. 230–249. doi 10.2174/1389202911314040002
- Bedford M.R., Partridge G.G.* Enzymes in farm animal nutrition. UK: CAB International, 2010. 319 p.
- Bedford M.R.* Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits // *Animal Feed Sci. Technol.* 2000. V. 86. P. 1–13.
- Darabzadeh N., Hamidi-Esfahani Z., Hejazi P.* Improvement of cellulase production and its characteristics by inducing mutation on *Trichoderma reesei* 2414 under solid state fermentation on rice by-products // *Appl. Food Biotechnol.* 2018. V. 5. P. 11–18.
- Du W., Sun C., Liang J., Han Y., Yu J., Liang Z.* Improvement of laccase production and its characterization by mutagenesis // *J. Food Biochem.* 2015. V. 39. P. 101–108. doi 10.1111/jfbc.12111
- Gusakov A.V.* Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 419–425.
- Hassan L., Reppke M.J., Thieme N., Schweizer S.A., Mueller C.W., Benz J.P.* Comparing the physicochemical parameters of three celluloses reveals new insights into substrate suitability for fungal enzyme production // *Fungal Biol. Biotechnol.* 2017. V. 4. № 10. doi 10.1186/s40694-017-0039-9
- Herpoël-Gimbert I., Margeot A., Dolla A., Jan G., Mollé D., Lignon S., Mathis H., Sigoillot J.-C., Monot F., Asther M.E.* Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains // *Biotechnol. for Biofuels*. 2008. V. 1:18. doi 10.1186/1754-6834-1-1
- Khattak F.M., Pasha T.N., Hayat Z., Mahmud A.* Enzymes in poultry nutrition // *J. Anim. Pl. Sci.* 2006. V. 16. № 1–2. P. 1–7.
- Miettinen-Oinonen Arja.* *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. Espoo: VTT Publications 550, 2004. 143 p.
- Oliveira M.M.Q., Grigorevski-Lima A.L., Franco-Cirigliano M.N., Nascimento R.P., Bon E.P.S., Coelho R.R.R.* *Trichoderma atroviride* 102C1 mutant: A high endoxylanase producer for assisting lignocellulosic material degradation // *J. Microb. Biochem. Technol.* 2014. V. 6. P. 236–241. doi 10.4172/1948-5948.1000150
- Ottenheim C., Werner K.A., Zimmermann W., Wu J.C.* Improved endoxylanase production and colony morphology of *Aspergillus niger* DSM 26641 by γ -ray induced mutagenesis // *Biochem. Engin. J.* 2015. V. 94. P. 9–14.
- Pathak S.S., Sandhu S.S., Rajak R.C.* Mutation studies on fungal glucoamylase: a review // *IJPBS*. 2015. V. 5. I. 2. P. 297–308.
- Peterson R., Nevalainen H.* *Trichoderma reesei* RUT-C30 – Thirty years of strain improvement // *Microbiology (SGM)*. 2012. V. 158. P. 58–68. doi 10.1099/mic.0.054031-0
- Polizeli M.L., Rizzatti A.C., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 67. P. 577–591.
- Portnoy T., Margeot A., Seidl-Seiboth V., Le Crom S., Chaabane F.B., Seiboth B., Kubicek C.P.* Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulose // *Eukar. Cell*. 2011. V. 10. P. 262–271.
- Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P.* Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair // *J. Nucl. Acids*. 2010. V. 2010. doi 10.4061/2010/592980
- Sajith S., Priji P., Sreedevi S., Benjamin S.* An Overview on fungal cellulases with an industrial perspective // *J. Nutr. Food Sci.* 2016. V. 6:461. doi 10.4172/2155-9600.1000461
- Seidl V., Seiboth B.* *Trichoderma reesei*: genetic approaches to improving strain efficiency // *Biofuels*. 2010. V. 1. I. 2. P. 343–354. doi 10.4155/bfs.10.1
- Shafique S., Bajwa R., Shafique S.* Molecular characterisation of UV and chemically induced mutants of *Trichoderma reesei* FCBP-364 // *Nat Prod Res.* 2010. V. 24. I. 15. P. 1438–1448. doi 10.1080/14786410903132399
- Vardhan P.V., Shukla L.I.* Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production // *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. V. 93. I. 9. P. 967–979. doi 10.1080/09553002.2017.1344788
- Walia A., Guleria S., Mehta P., Chauhan A., Parkash J.* Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper bleaching: a review // *3 Biotech*. 2017. V. 7:11. doi 10.1007/s13205-016-0584-6
- Wang S.B., Ivanova Ch., Seidl-Seiboth V.* *Trichoderma reesei*: A fungal enzyme producer for cellulosic biofuels // *Biofuel Production – Recent Developments and Prospects* / Eds. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes. InTech, 2011. V. 13. P. 309–340. doi 10.5772/959
- Wang S., Liu G., Wang J., Yu J., Huang B., Xing M.* Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 40. I. 6. P. 633–641. doi 10.1007/s10295-013-1253-y

Improvement of Activity of Carbohydrases with Endo-Depolymerase Action in *Trichoderma reesei* Using Mutagenesis

E. V. Kostyleva^{1, *}, N. V. Tsurikova¹, A. S. Sereda¹, I. A. Velikoretskaya¹, T. N. Veselkina¹,
N. S. Lobanov², I. A. Shashkov³, and A. P. Sinitsyn^{3, 4}

¹All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of FRC of food, biotechnology, and food safety, Moscow, Russia

²Kurchatov Institute, Moscow, Russia

³Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴Chemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Received April 2, 2018

In order to obtain feed enzyme preparations with increased activity of endo-carbohydrases of depolymerase action, a mutagenesis of the *Trichoderma reesei* strain was carried out using ultraviolet and ionizing irradiation. Method of fractionated UV-irradiation allowed increasing the endoglucanase activity by 20%, xylanase activity – by 80% compared to the original strain. The greatest effect was achieved after multistage gamma mutagenesis on a cobalt source. When the mutant *T. reesei-Co-44* was cultured in shaking flasks, its endoglucanase activity was increased 5-fold, xylanase activity – more than 8-fold with respect to the original strain. High activity of the target enzymes in the mutant strains was confirmed by results of fed-batch cultivation in laboratory fermenters with lactose feeding as a carbon source and an inducer of cellulases and xylanases biosynthesis. The maximum activity of endoglucanase and xylanase was achieved by culturing strain *T. reesei-Co-44* obtained as a result of gamma mutagenesis and amounted to 1324.2 ± 70.1 and 3394 ± 164 units/ml, respectively. This activity level makes it possible to produce competitive enzyme preparations of carbohydrases for fodder production.

Keywords: *Trichoderma reesei*, endoglucanase, xylanase, mutagenesis, enzyme preparations

PARACOCCLUS SIMPLEX SP. NOV. – НОВЫЙ ФАКУЛЬТАТИВНЫЙ МЕТИЛОТРОФ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЙ МЕТИЛАМИН

© 2018 г. Н. В. Доронина^{а, *}, Е. Н. Капаруллина^а, А. А. Чемодурова^б, Ю. А. Троценко^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Россия

^бПушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 22.02.2018 г.

Из ила пресного озера на юге Московской области выделен факультативный метилотроф штамм F5^T, использующий в качестве источников углерода и энергии метиламин и широкий спектр полиуглеродных субстратов. Клетки штамма F5^T – граммотрицательные, кокковидные, неспорообразующие, неподвижные, бесцветные, размножаются бинарным делением, имеют капсулу. Мезофил, нейтрофил, негалофил. Оксидазо- и каталазоположительный. Нитраты восстанавливает до нитритов. Метиламин окисляет аминдегидрогеназой и реализует ицл⁻ сериновый путь C₁-метаболизма, о чем свидетельствуют активности оксипируватредуктазы и серин-глиоксилатаминотрансферазы и отсутствие гексулозофосфатсинтазы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1ω7c} (72.3%) и C_{16:0} (11.6%) кислоты. Доминирующими фосфолипидами являются фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилэтаноламин. Содержание Г + Ц в ДНК составляет 65.8 мол. % (T_{пл}). Доминирующий убихинон – Q₁₀. Штамм F5^T имеет высокий уровень сходства гена 16S рРНК с представителями рода *Paracoccus*: *P. aminovorans* JCM7685^T = VKM В-2140^T (98.0%), *P. huijuniae* FLN-7^T (97.9%) и *P. limosus* NB88^T (97.5%). Однако ДНК–ДНК гомология штамма F5^T и *P. aminovorans*^T составила только 21 ± 3%. На основании полученных данных штамм F5^T идентифицирован как новый вид рода *Paracoccus*, для которого предложено название *Paracoccus simplex* sp. nov. (= VKM В-3226^T = CCUG 71989^T).

Ключевые слова: *Paracoccus simplex* sp. nov., факультативный метилотроф

DOI: 10.1134/S0026365618050075

Род *Paracoccus* принадлежит к семейству *Rhodobacteraceae*, порядку *Rhodobacterales*, классу *Alphaproteobacteria* и впервые описан Davis et al. (1969), позднее описание уточнено (Katayama et al., 1995; Liu et al., 2008). Новая информация обобщена и представлена в главах 3- и 4-го изданий “Prokaryotes” (Kelly et al., 2006a, 2006b; Pujalte et al., 2014). В настоящее время род включает 48 видов. Паракокки – граммотрицательные, кокки или короткие палочки, большинство неподвижные, но описаны представители с полярным жгутиком (*P. homiensis* DD-R11^T и *P. versutus* ATCC 25364^T) и перитрихи (*P. carotinofaciens* E-396^T). Размножаются бинарным делением, колонии некоторых видов имеют оранжевую окраску, обусловленную образованием каротиноидов. Каталазо- и оксидазоположительные, содержат доминирующий убихинон Q₁₀, однако у *P. yeii* CDC G1212^T доминирует Q₈. Некоторые виды галофильные или галотолерантные. Паракокки – аэробные хемоорганотрофы, но некоторые виды могут использовать нитрат, который восстанавливают до нитрита или молекулярного азота. Типовой вид

Paracoccus denitrificans способен расти хемолитоавтотрофно, используя восстановленные соединения серы как субстраты или окисляя водород. Ряд видов паракокков являются факультативными метилотрофами и используют метанол или метиламин как источники углерода и энергии, но реализуют разные пути C₁-метаболизма. При автотрофном росте фиксация CO₂ происходит через цикл Кальвина, и такие виды рода *Paracoccus* имеют рибулозобисфосфаткарбоксилазу (РБФК), другие виды лишены РБФК и используют сериновый путь C₁-ассимиляции (*P. aminophilus*). Окисление метиламина катализируется метиламиндегидрогеназой или происходит через N-метилглутаматный путь. Таким образом, разные виды рода *Paracoccus* существенно различаются по физиолого-биохимическим свойствам.

Цель работы – физиолого-биохимическая характеристика и идентификация нового изолята факультативно-метилотрофных бактерий штамма F5^T, отнесенного к роду *Paracoccus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Штамм F5^T (VKM B-3226^T = CCUG 71989^T) выделен из прибрежного или небольшого пресного озера в окрестностях г. Пушкино (Московская область, Россия). 3 г ила помещали в колбу Эрленмейера (750 мл) с 200 мл среды “К” с метиламином гидрохлоридом 0.3% (в./об.) и культивировали при 28°C и 180 об./мин в течение 3 сут. Накопительную и чистую культуры получали, как описано ранее (Doronina et al., 2013). Чистоту культуры проверяли световой (“Nikon Eclipse Si”, Япония) и электронной (JEOL JEM-100B, “JEOL”, Япония) микроскопией, а также по однородности колоний на агаризованных средах с метиламином и глюкозой/пептоном. Изучение морфологии, хемотаксономических, физиолого-биохимических, культуральных свойств, а также выделение ДНК, секвенирование гена 16S рРНК, филогенетический анализ, определение G + Ц состава ДНК и ДНК–ДНК гибридизацию проводили как описано ранее (Doronina et al., 2013). Среда “К” содержала (г/л): KН₂РO₄ – 2.0; (NH₄)₂SO₄ – 2.0; NaCl – 0.5; MgSO₄ · 7H₂O – 0.125; FeSO₄ · 7H₂O – 0.002; pH 7.4. Культивирование проводили также на средах R2A, TSA и LB. *Paracoccus aminovorans* JCM7685^T = VKM B-2140^T использовали в качестве референтной культуры.

Получение экстрактов клеток и определение активности ферментов. Клетки собирали в экспоненциальной фазе роста центрифугированием при 6000 g, дважды отмывали 50 мМ Трис-НСI буфером (pH 7.4) и ресуспендировали в том же буфере. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonicator S-4000 (6 × 1 мин, с минутными перерывами) при охлаждении во льду. Неразрушенные клетки отделяли центрифугированием (14000 об./мин в течение 30 мин, 4°C). Супернатант использовали для энзимологического анализа.

Аминоксидазу определяли по образованию перекиси водорода (Haywood, Large, 1981). Реакционная смесь в 2 мл содержала: Трис-НСI буфер, pH 7.5 – 150 мкмоль; 10 U пероксидазы хрена, 1 мкмоль *o*-дианизидина, 16 мкмоль метиламина и экстракт. Реакцию начинали добавлением метиламина и регистрировали изменение экстинкции при 460 нм.

Дегидрогеназу метиламина определяли по восстановлению ДХФИФ в присутствии ФМС (Meiberg, Harder, 1978). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7.5 – 150; ДХФИФ – 0.8; ФМС – 4; KCN-2, экстракт, метиламин – 7. Реакцию начинали добавлением метиламина и регистрировали скорость изменения экстинкции при 600 нм.

N-метилглутаматдегидрогеназу определяли по образованию формальдегида, измерение которого проводили с реактивом Нэша (Nash, 1953). Ре-

акционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7.5 – 100, НАД⁺ – 0.25 и экстракт. Реакцию начинали добавлением N-метил-L-глутамата натрия (5 мкмоль).

Дегидрогеназы формальдегида и формиата определяли по восстановлению ДХФИФ (Johnson, Quayle, 1964). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7.5 – 50; ДХФИФ – 0.075; ФМС – 0.5; формальдегид – 10 или формиат – 50; экстракт. Реакцию начинали добавлением субстрата.

НАД⁺-зависимую формальдегиддегидрогеназу определяли по восстановлению НАД⁺ при 340 нм (Johnson, Quayle, 1964) Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7.0 – 50; НАД⁺ – 0.25; восстановленный глутатион – GSH (либо без него) – 10; формальдегид – 2; экстракт. Реакцию начинали добавлением формальдегида.

НАД⁺-зависимую формиатдегидрогеназу определяли по восстановлению НАД⁺ при 340 нм (Johnson, Quayle, 1964). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСI буфер, pH 7.5 – 50; НАД⁺ – 0.25; формиат – 50; экстракт. Реакцию начинали добавлением формиата.

Оксипируватредуктазу определяли по окислению НАД(Ф)Н (Blackmore, Quayle, 1970). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСI буфер, pH 7.4 – 100; НАД(Ф)Н – 0.5; экстракт. Реакцию начинали добавлением 5 мкмоль оксипирувата натрия. При наличии НАДН-редуктазы, полученный результат корректировали на окисление НАДН экстрактом без оксипирувата.

L-серин-глиоксилатаминотрансферазу определяли спектрофотометрически, регистрируя глиоксилат-зависимое образование оксипирувата из L-серина (Blackmore, Quayle, 1970). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСI буфер, pH 7.5 – 100; пиридоксальфосфат – 0.02; НАДН – 0.5; глиоксилат – 10; экстракт. Реакцию начинали добавлением 10 мкмоль L-серина. При наличии в экстрактах активности глиоксилатредуктазы в полученный результат вносили соответствующую поправку.

Рибулозобисфосфаткарбоксилазу определяли радиоизотопным методом по динамике включения NaH¹⁴CO₃ в кислотоустойчивый продукт. Реакционная смесь в 1 мл содержала (мкмоль): Трис-НСI буфер, pH 7.6 – 100; MgCl₂ – 2.5; глутатион восстановленный (GSH) – 10; рибулозо-1.5-бисфосфат (натриевая соль) – 0.25; экстракт и начинали реакцию NaH¹⁴CO₃ – 18 (20 мкюри). Реакцию проводили при 30°C, отбирали пробы объемом 0.02 мл в течение 20 мин с интервалом в 2 мин, наносили их на квадраты стекловолокнистой бумаги Whatman GF/F, фиксировали добавлением 0.05 мл 6N HCl, высушивали и измеряли радиоактивность.

Гексулозофосфатсинтазу определяли спектрофотометрически (Ferenci et al., 1974) по восстановлению НАДФ⁺ в опосредованной реакции с использованием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы. Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, рН 7.0; MgCl₂ – 8; НАДФ⁺ – 0.5; глюкозофосфатизомеразу из мышцы кролика – 1.68 мкмольных единиц; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (тип 7, “Sigma”) – 0.15 мкмольных единиц; рибозо-5-фосфат; экстракт. Реакцию начинали добавлением 5 мкмоль формальдегида.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу определяли по восстановлению НАДФ⁺ или НАД⁺ (Korndberg, Norecker, 1955). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, рН 7.5 – 150; MgCl₂ – 10; НАД(Ф)⁺ – 1.0; натриевая соль глюкозо-6-фосфата или натриевой соли 6-фосфоглюконата – 10; экстракт. Реакцию начинали добавлением соответствующего субстрата.

Альдолазу фруктозо-1.6-бисфосфата определяли с сопрягающим ферментом глицерофосфатдегидрогеназой (van Dijken, Quayle, 1977). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСl буфер, рН 7.5 – 100; СоCl₂ – 2; НАДН – 0.5; глицерофосфатдегидрогеназу – 0.36 ед; экстракт. Реакцию начинали добавлением 2 мкмоль фруктозо-1.6-бисфосфата.

Альдолазу 2-кето-3-дезоксиглюконоата определяли с сопрягающим ферментом лактатдегидрогеназой (Wood, 1971). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): имидазольный буфер, рН 8.0 – 50; 6-фосфоглюконат (натриевая соль) – 10; НАДН – 0.5; MgCl₂ – 5; дитиотрейтол – 2; лактатдегидрогеназу из мышцы свиньи (“Reanal”) – 5 ед; экстракт. Реакцию начинали добавлением 6-фосфоглюконоата. Контролем служила реакционная смесь без 6-фосфоглюконоата.

Изоцитратлиазу определяли спектрофотометрически по образованию фенилгидразона глиоксилата при 324 нм (Dixon, Kornberg, 1959). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, рН 6.8 – 150; MgCl₂ – 10; фенилгидразин – 6.5; цистеин-НСl – 4; экстракт. Реакцию начинали добавлением 5 мкмоль изоцитрата калия.

Глутаматдегидрогеназу определяли в реакционной смеси, содержащей в 2 мл (мкмоль): Трис-НСl буфер, рН 7.5–100; NH₄Cl – 80, НАД(Ф)Н – 0.5, экстракт. Реакцию начинали добавлением 10 мкмоль α-кетоглутарата.

Глутаматсинтазу определяли по окислению НАД(Ф)Н (Meers, Tempest, 1970). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСl буфер, рН 7.6 – 100, α-кетоглутарат – 10, НАДН или

НАДФН – 0.25, экстракт. Реакцию начинали добавлением 25 мкмоль глутамин.

Глутаминсинтазу определяли колориметрически модифицированным методом (Elliot et al., 1955) в γ-глутаминтрансферазной реакции. Реакционная смесь в 7.52 мл содержала (мкмоль): имидазольный буфер, рН 7.15, MgCl₂ – 0.27, арсенат натрия – 12.5, АДФ – 0.18, гидроксилламин – 20, экстракт. Реакцию начинали добавлением 20 мкмоль L-глутамин, смесь инкубировали 10 мин при 30°C и добавляли 0.6 мл раствора, содержащего 55 г FeCl₃, 20 г трихлоруксусной кислоты и 21 мл HCl в 1 л воды. Контролем служила смесь без L-глутамин. Образующийся осадок удаляли центрифугированием и измеряли поглощение при 540 нм. 0.63 единицы поглощения соответствует 1 мкмоль/мл γ-глутамилгидроксамата – продукта реакции.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре “Shimadzu UV-1700” (Япония) в термостатируемой кювете при 30°C. Активность ферментов выражали как число наномолей превращенного субстрата или образованного продукта за 1 мин в пересчете на 1 мг белка. Для определения удельной активности подбирали такое количество белка, при котором скорость линейно зависела от концентрации фермента. При расчетах использовали следующие коэффициенты молярной экстинкции мкмоль⁻¹ см⁻¹: НАД(Ф)Н (при 340 нм) 6.22; ДХФИФ (при 600 нм) 21.9; о-дианизина (при 460 нм) 28.8. Радиометрические измерения проводили на жидкостном сцинтилляционном регистрирующем спектрометре LS6500 Multi-Purpose Scintillating Counter (“Beckman Coulter”, США) в смеси, содержащей 4 г 2,5-дифенилоксазола (ППО) и 0.05 г 1,3-ди 2/5-фенилоксазола бензола (ПОПОП) в 1 л толуола.

Количественное определение белка проводили методом Лоури (Lowry et al., 1951). Использовали реактивы фирмы “Sigma” (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология изолята. Штамм F5^T представлен грамтрицательными неподвижными кокковидными клетками 0.4–0.7 × 0.5–0.9 мкм (рис. 1а, 1б), имеющими капсулу. Споры и пигмент не образует, размножается бинарным делением. Колонии на агаризованной среде R2A округлые, белые, блестящие, прозрачные, диаметром 2–3 мм (3 сут, 29°C) с волнистым краем и вязкой консистенцией.

Культуральные, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства. Штамм F5^T рос в жидкой среде “К” с метиламином без агрегации клеток, пигмент не образовывал. Аэроб, каталазо- и оксидазоположительный, в витаминах и других факторах роста не нуждался. Рос при температурах

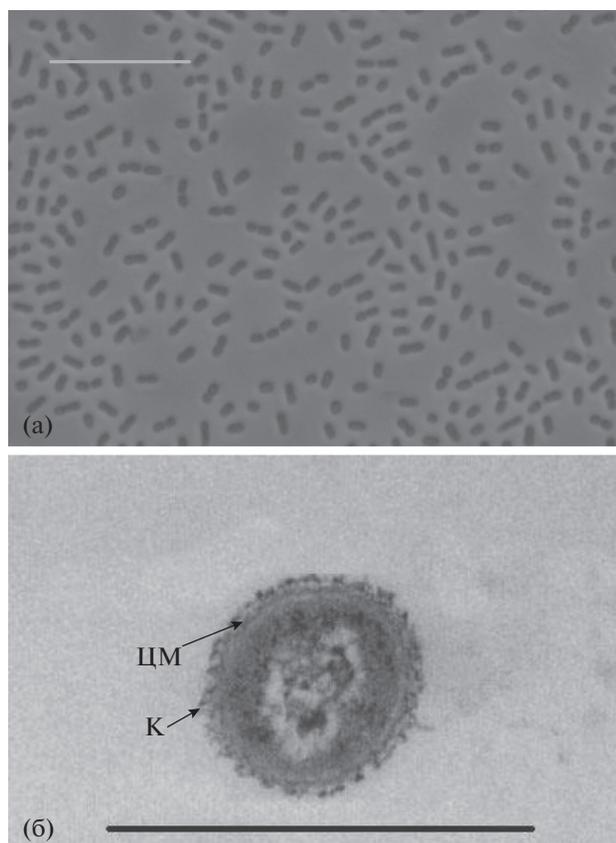


Рис. 1. Морфология клеток штамма F5^T, выращенных на метиламине: а — фазовый контраст клеток, длина масштабной метки 10 мкм; б — ультратонкий срез клеток, показывающий граммотрицательный тип клеточной стенки и наличие внешней капсулы. Стрелками указаны: ЦМ — цитоплазматическая мембрана; К — капсула. Длина масштабной метки 1 мкм.

от 17 до 37°C (оптимально при 28–30°C) и pH 5.5–8.0 (оптимально при pH 7.0–7.5). В качестве источников углерода и энергии использовал широкий спектр субстратов: метиламин, триметиламин, этанол, глюкозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, маннозу, трегалозу, рибозу, сахарозу, сукцинат, пируват, α -кетоглутарат, малат, ацетат, бетаин, аланин, серин, валин, инозит, маннит, ацетамид, глюкуроновую кислоту. Не рос на метаноле, диметиламине, формиате, диметилсульфоксиде, диметилформамиде, дихлорметане, арабинозе, лактозе, ксилозе, глутамате, аспартате, а также в газовой смеси $H_2/CO_2/O_2$. В качестве источников азота использовал аммоний и нитраты. Обладал способностью к нитратредукции. Гидролизировал крахмал. Не имел желатиназы. Оптимальная концентрация NaCl в среде 0.05%, но наблюдался рост до 2.5% NaCl и полностью отсутствовал при 3.5% NaCl.

Штамм был чувствителен к следующим антибиотикам (мкг/диск): ампициллину (10), гентамицину (10), линкомицину (2), налидиксовой

кислоте (30), новобиоцину (30) и стрептомицину (10). Устойчив к канамицину (30), неомицину (30 и эритромицину (15). В жирнокислотном составе клеток присутствовали $C_{18:1\omega7c}$ (72.3%), $C_{16:0}$ (11.6%), $C_{18:0}$ (3.2%) и $C_{19:0\ cyclo}$ (1.9%) жирные кислоты. Доминирующие фосфолипиды — фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилэтанолламин (рис. 2). Доминирующий убихинон Q_{10} .

Метаболическая характеристика. Результаты энзимологического анализа клеток, выращенных на метиламине, представлены в табл. 1. Установлено, что штамм F5^T имеет высокую активность метиламиндегидрогеназы, проявляющую активность с феназинметосульфатом (ФМС). Продукт этой реакции — формальдегид — окисляется до формиата $НАД^+$ -глутатионзависимой дегидрогеназой и далее до CO_2 $НАД^+$ -зависимой дегидрогеназой формиата. Аминоксидаза и N-метилглутаматдегидрогеназа отсутствуют.

Обнаружены активности оксипируватредуктазы и серин-глиоксилат аминотрансферазы. Не выявлены активности 3-гексулозофосфатсинтазы и рибулозо-1.5-бисфосфаткарбоксилазы. Активность изоцитратлиаза очень низкая. Очевидно, этот фермент не связан с C_1 -метаболизмом. Следовательно, штамм F5^T реализует изоцитратлиазоотрицательный (ицл⁻) вариант серинового пути. Изоцитратдегидрогеназа зависит от $НАДФ^+$. Первичное вовлечение аммонийного азота осуществляется через глутаматный путь и глутаматдегидрогеназой. Активности ферментов углеводного метаболизма очень низкие.

Филогенетический анализ. Секвенирование гена 16S рРНК исследуемого штамма F5^T (1405 п.н.) выявило высокий уровень сходства с представителями рода *Paracoccus*: 98.0% с *P. aminovorans* JCM 7685^T (D32240), 97.9% с *P. huijuniae* FLN-7^T (EU725799), а также 97.5% с *P. limosus* NB88^T (HQ336256) (рис. 3). Содержание пар Г + Ц в ДНК штамма F5^T составило 65.8 мол. %. Уровень ДНК–ДНК гомологии штамма F5^T и *P. aminovorans* JCM 7685^T составил только $21 \pm 3\%$. Для филогенетической характеристики штамма F5^T использовали также ген, кодирующий малую субъединицу метиламиндегидрогеназы — *mauA*. Филогенетическое положение штамма F5^T, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей *MauA* представлено на рис. 4. Показано, что наибольшее сходство 96–100% по белку *MauA* штамм F5^T имел с представителями рода *Paracoccus* и некоторыми бактериями других родов: *Methylobacterium* (90–92%), *Methylophilum* (89–91%) и *Methylophaga* (77–78%).

Результаты проведенного полифазного анализа показали, что штамм F5^T представляет новый

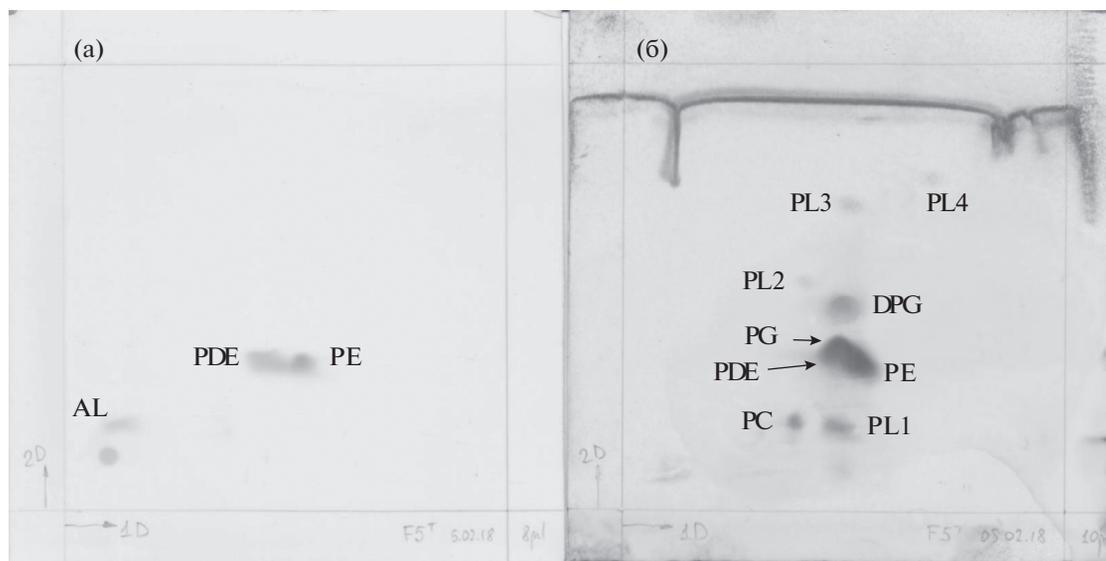


Рис. 2. Двумерная хроматография полярных липидов штамма *Paracoccus simplex* F5^T. 1 направление – хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4); 2 направление – хлороформ–метанол–уксусная кислота–вода (85 : 12 : 15 : 4). а – детекция аминоксодержащих липидов 0.2% нингидрином в ацетоне; б – детекция фосфорсодержащих липидов молибденовым синим. Фосфатидилхолин (PC); фосфатидилглицерин (PG); фосфатидилэтаноламин (PE); дифосфатидилэтаноламин (PDE), дифосфатидилглицерин (DPG); неидентифицированные фосфолипиды (PL1–4); неидентифицированные аминоксодержащие липиды (AL).

Таблица 1. Активности ферментов первичного и промежуточного метаболизма в экстрактах клеток штамма F5^T, выращенного на метиламине*

Фермент	Кофактор	Активность, нмоль/мин·мг белка
Метиламиндегидрогеназа	ФМС НАД ⁺	111 0
Аминоксидаза		0
N-метилглутаматдегидрогеназа		0
Формальдегиддегидрогеназа	ФМС НАД ⁺ НАД ⁺ GSH	0 37 800
Формиатдегидрогеназа	ФМС НАД ⁺	0 11
Оксипируватредуктаза	НАДН НАДФН	147 0
Серин-глиоксилатаминотрансфераза	НАДН НАДФН	120 34
Изоцитратлиаза		1
3-Гексулозофосфатсинтаза		0
Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза		0
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	НАД ⁺ НАДФ ⁺	0 6
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	НАД ⁺ НАДФ ⁺	0 14
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза		15
2-Кето-3-деокси-6-фосфоглюконатальдолаза		0
Изоцитратдегидрогеназа	НАД ⁺ НАДФ ⁺	8 177
Глутаматдегидрогеназа	НАДН НАДФН	47 362
Глутаматсинтаза	НАДН НАДФН	26 45
Глутаминсинтетаза	АТФ, Мп ²⁺	15

* Средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала ±5%), ФМС – феназинметосульфат, GSH – восстановленный глутатион.

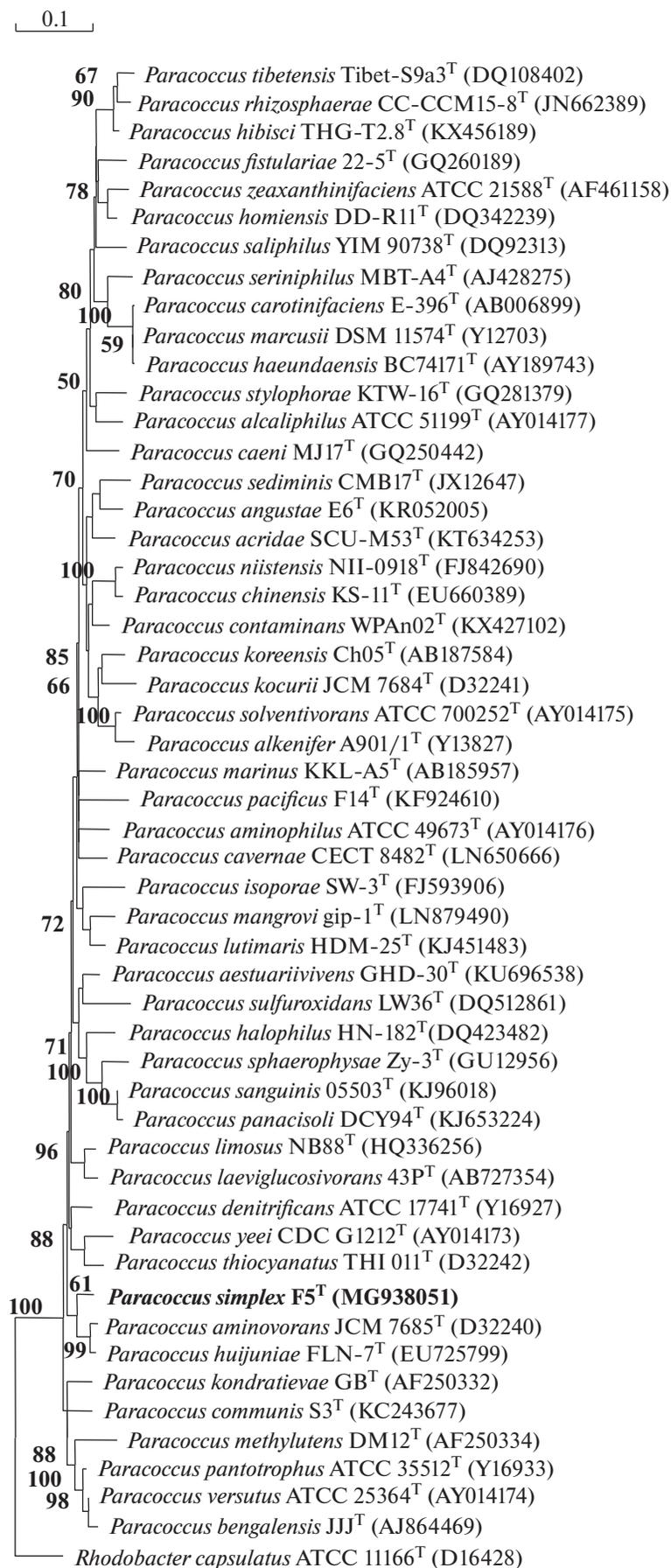


Таблица 2. Сравнительная характеристика *Paracoccus simplex* F5^T и филогенетически близких видов: 1 – *P. simplex* F5^T sp. nov.; 2 – *P. aminovorans* JCM 7685^T (Urakami et al., 1990); 3 – *P. huijuniae* FLN-7^T (Sun et al., 2013); 4 – *P. li-mosus* NB88^T (Lee, Lee, 2013)

Характеристика	1	2	3	4
Размер клеток, мкм	0.4–0.7 × 0.5–0.9	0.5–0.9 × 0.9–2.0	0.4–0.5 × 0.7–1.1	0.8–0.9 × 0.9–1.1
Цвет колоний	Белые	Белые-бледно желтые	Бледно-желтые	Кремово-белые
Температурный диапазон роста, (оптимум), °C	17–37 (28–30)	20–37 (30–37)	4–42 (28)	20–37 (30)
Диапазон (оптимум) pH	5.5–8.0 (7.0–7.5)	6.0–9.0 (6.5–8.0)	5.0–8.0 (7.0)	6.0–9.0 (7.0)
Рост при 4% (в./об.) NaCl	–	–	+	+
Триптофандезаминаза	+	–	–	Н.о
Источники углерода:				
Ацетат	+	+	–	+
Глюконат	+	+	–	–
Д-глюкоза	+	–	+	+
Д-рибоза	+	–	–	+
Д-манноза	+	–	+	w
Арабиноза	+	–	+	+
Мальтоза	+	–	–	–
Сахароза	+	–	–	+
L-аланин	+	+	–	+
L-серин	+	v	–	+
Метанол	–	–	+	Н.о.
Метиламин	+	+	+	Н.о.
Диметиламин	-	+	Н.о.	Н.о.
Триметиламин	+	+	Н.о.	Н.о.
Жирные кислоты				
C _{17:0}	–	–	+	+
C _{19:0 cyc}	+	+	+	–
Г + Ц в ДНК (мол. %)	65.8	67.0	66.4	66.4

Примечание. Н.о. – не определяли; v – вариабелен.

Описание *Paracoccus simplex* sp. nov.

Paracoccus simplex sp. nov. (*sim'plex*. *L.adj. simplex*, *simple*, простой)

Клетки – грамотрицательные, неподвижные, неспорообразующие кокки $0.4\text{--}0.7 \times 0.5\text{--}0.9$ мкм, размножаются бинарным делением, имеют капсулу. Колонии на среде R2A округлые, белые, блестящие, прозрачные, диаметром 2–3 мм с волнистым краем и вязкой консистенцией. Растет в диапазоне температур от 17 до 37°C с оптимумом при 28–30°C и при pH от 5.5 до 8.0, оптимально при pH 7.0–7.5. Не растет при 3.5% NaCl в среде. Растет на R2A, TSA и LB агаре. Облигатный аэроб. Не растет в анаэробных условиях и не использует нитрат в качестве акцептора электронов. Оксидазо-каталазоположителен, уреазоотрицателен. Нитраты восстанавливает до нитритов. Не имеет активностей β-галактозидазы, аргининди-гидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы. Обладает активностью триптофандезаминазы, образует индол и ацетоин. Растет на метиламине, триметиламине, этаноле, глюкозе, галактозе, фруктозе, мальтозе, маннозе, трегалозе, рибозе, сахарозе, сукцинате, пирувате, α-кетоглутарате, малате, ацетате, бетаине, аланине, серине, валине, инозите, манните, ацетамиде, глюкоуроновой кислоте. Не растет на метаноле, диметиламине, формиате, диметилсульфоксиде, диметилформамиде, дихлорметане, арабинозе, лактозе, ксилозе, глутамате, аспартате, а также в газовой смеси H₂/CO₂/O₂. Не нуждается в витаминах и ростовых факторах. Реализует изоцитратлиазоотрицательный (исц⁻) вариант серинового пути. Доминирующий дыхательный хинон – Q₁₀. В жирнокислотном составе клеток более 70% составляет C_{18:1ω7c}. Присутствуют также C_{16:0} (11.6%), C_{18:0} (3.2%) и C_{19:0yc} (1.9%) кислоты. Фосфолипидный состав клеток включает фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилэтанолламин. Содержание Г + Ц пар в ДНК штамма F5^T составляет 65.8 мол. %. Последовательности генов 16S рРНК и *tauA* штамма F5^T депонированы в GenBank под номерами MG938051 и MN059568 соответственно. Типовой штамм F5^T (= VKM В-3226^T = CCUG 71989^T) выделен из прибрежного ила пресного озера в окрестности г. Пушкино, Московская область (Россия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blackmore M.A., Quayle J.R. Microbial growth on oxalate by a route not involving glyoxylate carboligase // *Biochem. J.* 1970. V. 118. P. 53–59.
- Davis D.H., Doudoroff M., Stanier R.Y., Mandel M. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1969. V. 19. P. 375–390.
- Dixon G.H., Kornberg H.L. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle // *Proceedings of the biochemical society.* 1959. P. 3.
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A. *Methylopi-la musalis* sp. nov., an aerobic facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1847–1852.
- Elliot W.H., Kaplan N.O. In: *Methods in Enzymol.* / Eds. Colowick S.P., Kaplan N.O. N.Y.: Acad. Press., 1955. V. 11. P. 337.
- Ferenci T., Strom T., Quayle J.R. Purification and properties of 3-hexulose phosphate synthase and phospho-3-hexuloisomerase from *Methylococcus capsulatus* // *Biochem. J.* 1974. V. 144. P. 477–486.
- Haywood G.W., Large P.J. Microbial oxidation of amines // *Biochem. J.* 1981. V. 199. P. 187–201.
- Johnson P.A., Quayle J.R. Microbial growth on C₁-compounds. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by methanol-grown *Pseudomonas* AM1 // *Biochem. J.* 1964. V. 93. P. 281–290.
- Katayama Y., Hiraishi A., Kuraishi H. *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus // *Microbiol.* 1995. V. 141. P. 1469–1477.
- Kelly D., Rainey F., Wood A. The Genus *Paracoccus* // *The Prokaryotes*, vol 5, 3rd edn, Proteobacteria – alpha and beta subclasses / Eds. Rosenberg E., Stackebrandt E., Thompson F., Lory S., DeLong E. Berlin–Heidelberg: Springer, 2006a. P. 232–249.
- Kelly D.P., Euzeby J.P., Goodhew C.F., Wood A.P. Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strains held by international culture collections // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006b. V. 56. P. 2495–2500.
- Kornberg A., Horecker B.L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Methods in Enzymol.* 1955. V. 1. P. 323.
- Lee M.J., Lee S.S. *Paracoccus limosus* sp. nov., isolated from activated sludge in a sewage treatment plant // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1311–1316.
- Liu Z.P., Wang B.J., Liu X.Y., Dai X., Liu Y.H., Liu S.J. *Paracoccus halophilus* sp. nov., isolated from marine sediment of the South China Sea, China, and emended description of the genus *Paracoccus* Davis 1969 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 257–261.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
- Meers J.L., Tempest D.W., Brown C.M. Glutamine (amide): α-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP) an enzyme involved in biosynthesis of glutamate by some bacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1970. V. 64. P. 187–194.
- Meiberg J.B.M., Harder W. Aerobic and anaerobic metabolism of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in *Hyphomicrobium* sp. X // *J. Gen. Microbiol.* 1978. V. 106. P. 265–276.
- Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction // *Biochem. J.* 1953. V. 55. P. 416–421.
- Pujalte M.J., Lucena T., Ruvira M.A., Arahal D.R., Macia'n M.C. The *Paracoccus* Group // *The Prokaryotes – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 4rd edn. / Eds. Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. P. 460.

Sun L.N., Zhang J., Kwon S.W., He J., Zhou S.G., Li S.P. *Paracoccus huijuniae* sp. nov., an amide pesticide-degrading bacterium isolated from activated sludge of a wastewater biotreatment system // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 1132–1137.

Urakami T., Araki H., Oyanagi H., Suzuki K.I., Komagata K. *Paracoccus aminophilus* sp. nov. and *Paracoccus aminovo-*

rans sp. nov., which utilize N,N-dimethylformamide // Int. J. Syst. Bacteriol. 1990. V. 40. P. 287–291.

Van Dijken J.P., Quayle J.R. Fructose metabolism in four *Pseudomonas* species // Arch. Microbiol. 1977. V. 114. P. 281–286.

Wood W.A. Assay of enzymes representative of metabolic pathways // Meth. Microbiol. 1971. V. 6A. P. 421.

***Paracoccus simplex* sp. nov., a New Methylamine-Utilizing Facultative Methylotroph**

N. V. Doronina^{1,*}, E. N. Kaparullina¹, A. A. Chemodurova², and Yu. A. Trotsenko¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

²Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russia

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Received February 22, 2018

Abstract—A facultative methylotroph, strain F5^T, which uses methylamine and a broad spectrum of polycarbon substrates as carbon and energy sources, was isolated from silt of a freshwater lake in the southern Moscow region. The cells were gram-negative, coccoid, non-spore-forming, nonmotile, colorless, reproducing by binary fission and possessing a capsule. The organism was mesophilic, neutrophilic, not halophilic, oxidase- and catalase-positive, and capable of nitrate reduction to nitrite. Methylamine was oxidized by amine dehydrogenase and via the icl⁻ serine pathway of C₁ metabolism, as was indicated by activities of hydroxypyruvate reductase and serine-glyoxylate aminotransferase and by the absence of hexulosephosphate synthase and ribulose biphosphate carboxylase. Predominant fatty acids were C_{18:1ω7c} (72.3%) and C_{16:0} (11.6%). Phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, and phosphatidylethanolamine were the dominant phospholipids. The G + C DNA content was 65.8 mol % (T_m). Q₁₀ was the dominant ubiquinone. Strain F5^T exhibited high similarity of the 16S rRNA gene sequences with *Paracoccus* strains: *P. aminovorans* JCM7685^T = VKM B-2140^T (98.0%), *P. huijuniae* FLN-7^T (97.9%), and *P. limosus* NB88^T (97.5%). However, the level of DNA-DNA relatedness between the strains F5^T and *P. aminovorans*^T was only 21 ± 3%. Based on the data obtained, strain F5^T was identified as a new *Paracoccus* species with proposed name *Paracoccus simplex* sp. nov. (= VKM B-3226^T = CCUG 71989^T).

Keywords: *Paracoccus simplex* sp. nov., facultative methylotroph

METHYLOPHILUS AQUATICUS SP. NOV. – НОВАЯ АЭРОБНАЯ МЕТИЛОТРОФНАЯ БАКТЕРИЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ПРЕСНОГО ВОДОЕМА

© 2018 г. Е. Н. Капарулина^а, *, Н. В. Агафонова^а, Ю.А. Троценко^а, Н. В. Доронина^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пущино, Россия

*e-mail: lenokap80@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2018 г.

Из воды небольшого пресного водоема выделен новый ограниченно-факультативный метилотроф – штамм ЛТК^Т, реализующий КДФГ-вариант рибулозомонофосфатного пути C₁-метаболизма. Изолят представлен аэробными, грамотрицательными, неспорообразующими, неподвижными палочками, размножается бинарным делением, является мезофилом и нейтрофилом, синтезирует индолпроизводные. В жирнокислотном составе клеток преобладают гексадекановая (C_{16:0}) и *цис*-9-гексадеценная (C_{16:1(ω7)}) кислоты, основной убихинон – Q₈. Доминирующими фосфолипидами являются фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин; дифосфатидилглицерин отсутствует. Не обнаружены активности α-кетоглутаратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы. Аммоний ассимилирует посредством системы ферментов глутаматного цикла. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма ЛТК^Т имеет высокий уровень сходства с таковыми у представителей рода *Methylophilus* – 99.6% с *M. leisingeri* DM11^Т и 99.4% с *M. flavus* Ship^Т, уровень ДНК–ДНК гомологии между штаммом ЛТК^Т и *M. leisingeri* DM11^Т и *M. flavus* Ship^Т составил 47 и 40% соответственно. По совокупности полученных данных штамм ЛТК^Т отнесен к новому виду *Methylophilus aquaticus* sp. nov. (= VKM В-3159^Т = JCM 32032^Т = CCUG 70602^Т).

Ключевые слова: *Methylophilus aquaticus* sp. nov., аэробный метилотроф, рибулозомонофосфатный путь

DOI: 10.1134/S0026365618050117

Из пресного водоема полуострова Крым (Россия) нами выделен ограниченно-факультативный метилотроф – штамм ЛТК^Т. Секвенирование гена 16S рРНК нового изолята выявило его принадлежность к роду *Methylophilus*. Род *Methylophilus*, впервые описанный Дженкинсом (Jenkins et al., 1987), является типовым родом семейства *Methylophilaceae* порядка *Methylophilales* (Doronina et al., 2014). Представители рода *Methylophilus* – облигатные или ограниченно-факультативные аэробные метилотрофные бактерии, реализуют рибулозомонофосфатный путь C₁-ассимиляции. В составе клеток представителей этого рода характерно высокое содержание C_{16:0} и C_{16:1} жирных кислот, убихинона Q₈, отсутствие активности глутаматдегидрогеназы и дифосфатидилглицерина в фосфолипидном профиле. Содержание Г + Ц в ДНК составляет 50–54 мол. %. К настоящему времени валидно описаны семь видов рода *Methylophilus*: *M. methylotrophus* (Jenkins et al., 1987), *M. leisingeri* (Доронина, Троценко, 1994), *M. quaylei* (Doronina et al., 2005), *M. rhizosphaerae* (Madhaiyan et al., 2009), *M. flavus*, *M. luteus* (Gogleva et al., 2010) и *M. glucosoxydans* (Doronina et al., 2012). Представители этих видов были выделены из различных

источников, таких как сточные воды, активный ил, филлосфера и ризосфера растений, однако охарактеризованных изолятов из пресноводных экосистем в их числе до последнего времени не было. Недавно из осадков озера Вашингтон (США) был получен ряд культур бактерий рода *Methylophilus*, которые на основании анализа геномов были отнесены к виду *M. methylotrophus* (Beck et al., 2014). Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК типового штамма вида *M. methylotrophus*, однако, отличалась от таковой у полученного в настоящей работе изолята, штамма ЛТК^Т (98.9% сходства). Учитывая географическую удаленность и климатические отличия республики Крым и штата Вашингтон, представляло интерес выявить видовую принадлежность нового изолята ЛТК^Т.

Цель данной работы – физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика нового изолята – штамма ЛТК^Т.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Штамм ЛТК^Т выделен из небольшого пресного водоема в окрестностях

г. Гурзуф, республика Крым, Россия (44°33'88" с.ш., 34°16'83" в.д.). 10 мл природной воды помещали в колбу Эрленмейера (750 мл) с 200 мл среды "К" и 0.5% (об./об.) метанола. Среда "К" содержала (г/л): KH_2PO_4 – 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0; NaCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.002; pH 7.4. Накопительную и чистую культуру выделяли, как описано ранее (Kararullina et al., 2017). Чистоту культуры проверяли световой и электронной микроскопией, а также по однородности колоний на агаризованной среде с метанолом и отсутствию роста на среде LB.

В качестве референтных культур использовали *Methylophilus leisingeri* DM11^T (DSM 6813^T = VKM B-2013^T) и *M. flavus* Ship^T (CCUG 58411^T = DSM 23073^T = VKM B-2547^T).

Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств изолята. Для описания колоний, изучения морфологии и подвижности клеток штамм ЛТК^T выращивали на агаризованной среде "К" ("Difco", США, 2%). Способность изолята восстанавливать нитраты анализировали в жидкой среде, где аммонийный азот был заменен KNO_3 (1 г/л) после 1, 2 и 3 сут инкубации. Гидролиз крахмала оценивали по реакции с раствором Люголя после выращивания культуры на агаризованной среде "К" с добавлением 0.2% (в./об.) растворимого крахмала.

Наличие оксидазы определяли, используя 1% (в./об.) раствор тетраметил-*p*-фенилендиамин дигидрохлорида. Активность каталазы выявляли, нанося 3%-ный раствор перекиси водорода на штрих культуры, выращенной на агаризованной среде.

Температурный диапазон роста определяли, выращивая культуру в жидкой среде "К" с метанолом в герметично закрытых флаконах на качалке (120 об./мин) при температуре 4–43°C. Рост изолята при различных значениях концентрации метанола (0.1–7.0%, об./об.), солености (0–4% NaCl) и pH (5.0–9.0) исследовали на среде "К". Значения pH устанавливали добавлением 1 М NaOH и 5 н HCl .

При изучении способности изолята использовать различные органические соединения в качестве источника углерода и энергии в минеральную среду вместо метанола вносили 0.05–0.3% (в./об.) испытуемого вещества, инокулировали культурой и инкубировали 14 сут на качалке при оптимальной температуре. Все летучие вещества вносили в количестве 0.5% по объему.

Для определения спектра используемых субстратов и выявления некоторых биохимических свойств исследуемого штамма использовали также API тесты (API 20E, API 20NE; "Biomérieux", Франция), следуя инструкции производителя. Рост в атмосфере метана, дихлорметана или

$\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{O}_2$ анализировали, как описано ранее (Kararullina et al., 2017).

При исследовании способности культуры использовать различные источники азота в среду "К" вместо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вносили эквимольные по азоту количества тестируемых веществ.

Устойчивость к антибиотикам определяли с помощью дисков ("Bioanalyse", Турция), пропитанных следующими антибиотиками (мкг/диск): линкомицин (10), эритромицин (15), пенициллин (10), оксациллин (5), налидиксовая кислота (30), гентамицин (10), хлорамфеникол (30), канамицин (30), стрептомицин (10), новобиоцин (30), тетрациклин (30) и неомицин (30).

Образование индола из L-триптофана анализировали с реактивом Сальковского (Gordon, Weber, 1951). Калибровочную кривую строили со стандартными растворами индолилуксусной кислоты.

Микроскопия. Изучение морфологии и подвижности клеток в режиме фазового контраста проводили с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse Ci ("Nikon", Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT core5 ("Jenoptik", Германия). Электронную микроскопию клеток проводили с помощью электронного микроскопа JEM 100B ("Jeol", Япония), как описано ранее (Doronina et al., 2012).

Хемотаксономический анализ. Убихиноны экстрагировали из лиофильно-высушенных клеток, очищали по методу Коллинса (Collins, 1985) и анализировали на масс-спектрометре Finnigan MAT 8430 MS (Германия).

Жирнокислотный состав клеток, выращенных на агаризованной среде с метанолом в течение 48 ч, определяли известным методом (Doronina et al., 2012). Фосфолипидный состав клеток, выращенных на среде "К" с метанолом, анализировали двумерной тонкослойной хроматографией (Doronina et al., 2012).

Энзимологический анализ проводили в бесклеточном экстракте, как описано ранее (Trotsenko et al., 1986). Активность ферментов выражали в наномолях потребленного субстрата или образованного продукта за 1 мин в пересчете на 1 мг белка. Количественное определение белка проводили методом Лоури (Lowry et al., 1951).

RAPD-анализ (метод случайной амплификации полиморфной ДНК) проводили, используя праймеры OPQ1, OPQ6 (Balachandar et al., 2008) и RAPDA (Wellner et al., 2013).

Выделение и анализ ДНК. ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep ("Zymo Research", США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Г + Ц состав ДНК определяли тепловой денатурацией на спектрофотометре "Beckman DU-8B"

(США) при скорости нагрева 0.5°C/мин и рассчитывали, используя уравнение: $\text{мол. Г} + \text{Ц} = (T_{\text{пл}} \times 2.08) - 106.4$ (Owen, Lapage, 1976). В качестве стандарта использовали ДНК *Escherichia coli* К-12. Уровень ДНК–ДНК гомологии штамма ЛТК^Т с *Methylophilus leisingeri* DM11^Т и *M. flavus* Ship^Т определяли методом ДНК–ДНК реассоциации (Доронина и соавт., 1988).

Ген 16S рРНК амплифицировали ПЦР, используя универсальные для прокариот праймеры 27f и 1492r (Lane, 1991).

Фрагмент гена *mxaF* (482 п.н.), кодирующего большую субъединицу классической пирролохинолинхинон (PQQ)-зависимой метанолдегидрогеназы грамотрицательных бактерий, амплифицировали, используя праймеры 1003f и 1561r, согласно ранее описанному протоколу (McDonald, Murrell, 1997).

Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Выделение и очистку фрагментов ДНК из легкоплавкой агарозы проводили на колонках с использованием набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (“Zymo Research”, США), согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (“Beckman Coulter”, США) на анализаторе SEQ2000 XL (“Beckman Coulter”, США).

Филогенетический анализ. Предварительный филогенетический скрининг сходства последовательностей гена 16S рРНК и белка MxaF проводили по базе данных GeneBank (NCBI) с помощью пакета программ BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Обработку и перевод нуклеотидных последовательностей гена *mxaF* в аминокислотные проводили с использованием Gene Runner, версия 3.05 (Hastings Software, Inc.). Для более точного определения филогенетического положения изолятов нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и аминокислотные последовательности белка MxaF выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших прокариот с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ выполнен при помощи программы MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Филогенетические деревья (филограммы) строили методом присоединения соседей (“neighbor-joining”) (Saitou, Nei, 1987). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap-анализа” 100 альтернативных филограмм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология изолята. Штамм ЛТК^Т представлен неподвижными палочками (0.35–0.45 × 1.8–2.2 мкм), имеющими грамотрицательный тип клеточной стенки (рис. 1). Капсул и спор не обра-



Рис. 1. Ультратонкие срезы клеток штамма ЛТК^Т. Длина масштабной метки 1 мкм.

зуют, размножаются бинарным делением. На агаризованной минеральной среде с метанолом колонии бесцветные, точечные, менее 1 мм в диаметре, с выпуклым профилем, гладкой поверхностью, ровным краем, однородной структурой.

Культуральные, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства. Изучаемый штамм растет в жидкой среде “К” с метанолом без агрегации клеток, пигмент не образует. Строгий аэроб, каталазо- и оксидазоположительный, в витаминах не нуждается. Растет на метаноле и фруктозе. Не растет в атмосфере H₂/O₂/CO₂, метана, на средах с пептоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом, на метилированных аминах, дихлорметане, формиате, ацетате, сукцинате, фуларате, сахарозе, ксилозе, лактозе, галактозе, глюкозе, маннозе, манните, мальтозе, глюконате, каприновой, глюконовой, адипиновой кислотах, малате, цитрате, инозите, сорбите, рамнозе, мелибиозе, α-кетоглутарате, аланине, серине, ацетамиде, этаноле, диметилсульфоксиде. В качестве источников азота использует нитраты и аммоний. Отсутствует способность к нитратредукции, не имеет активности β-галактозидазы, орнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы, уреазы, а также желатиназы. Ацетоин не образует. На среде с нитратом как источником азота, 0.5% метанола и 1% триптофана образует производные индола (5.2 ± 0.2 мкг/мл культуральной жидкости при ОП₆₀₀ культуры 1.0). Растет при температуре 20–37°C и при pH 6.5–8.5. Оптимальный рост наблюдался при 28–30°C и pH 7.5–8.0 в присутствии в среде 0.5–5.0% метанола и 0–0.05% NaCl.

Штамм ЛТК^Т устойчив к действию линкомицина, пенициллина, хлорамфеникола, эритромицина. Чувствителен к гентамицину, стрептомицину, оксацилину, неомицину, налидиксовой кислоте, тетрациклину, новобиоцину, канамицину, ампициллину.

Таблица 1. Основные жирные кислоты штамма ЛТК^T и представителей типовых штаммов видов рода *Methylophilus*

Жирные кислоты	1	2	3	4	5	6	7
C _{14:0}	0.8	0.8	0.6	0.3	1.5	0.9	0.2
C _{15:0}	0	0.5	0.2	0.1	0.6	0	1.3
C _{16:0}	43.9	48.2	30.8	32.4	34.3	37.4	34.2
C _{16:1}	53.0	46.5	58.1	52.3	56.5	57.3	42.9
C _{17:0}	0	0.1	0	0.1	0	0.1	0.1
C _{17:1ω8}	1.3	0	0	0	0	0	0
C _{18:0}	0	0.3	0	0	0.3	0.6	2.9
C _{18:1}	0.5	1.1	0.6	0.6	1.1	2.0	1.2
<i>cyclo</i> C _{17:0}	0	1.1	0.4	3.2	1.5	1.8	3.5
C _{10:0} 3-ОН	0.5	1.0	0.8	0.6	0.4	1.1	1.1
C _{16:0} 2-ОН	0	0.5	8.2	9.4	1.9	0.7	12.5

Примечание. 1 – *M. aquaticus*; 2 – *M. leisingeri* (Доронина, Троценко, 1994); 3 – *M. flavus* (Gogleva et al., 2010); 4 – *M. luteus* (Gogleva et al., 2010); 5 – *M. methylophilus* (Jenkins et al., 1987); 6 – *M. quaylei* (Doronina et al., 2005); 7 – *M. glucosoxydans* (Doronina et al., 2012).

В жирнокислотном составе клеток штамма ЛТК^T преобладают гексадекановая C_{16:0} (43.9%) и *цис*-9-гексадеценная C_{16:1ω7c} (53.0%) (табл. 1). Основной убихинон Q₈. В фосфолипидном состав-

е клеток штамма ЛТК^T преобладают фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин (рис. 2).

Метаболическая характеристика. Результаты энзимологического анализа клеток, выращенных на метаноле, представлены в табл. 2. Выявлено, что штамм ЛТК^T окисляет метанол до формальдегида классической метанолдегидрогеназой, стимулируемой ионами аммония и проявляющей максимальную активность при pH 9.0. Активности дегидрогеназ формальдегида и формиата с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом (ФМС) выше, по сравнению с НАД-зависимыми формами этих ферментов. Штамм ЛТК^T реализует рибулозомонофосфатный путь C₁-метаболизма, о чем свидетельствуют активности ключевого фермента – гексулозофосфатсинтазы, а также дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата. Обнаружена активность 2-кето-3-дезоксис-6-фосфоглюконатаальдозы (КДФГА), следовательно, данный штамм реализует КДФГ-вариант РМФ-пути, что является типичной чертой облигатных и ограниченно-факультативных метилотрофов. Аммоний ассимилирует посредством системы ферментов глутаматного цикла (глутаматсинтазы/глутаминсинтазы). Активности α-кетоглутаратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы отсутствовали.

Генотипическая характеристика. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм ЛТК^T имеет наибольшее сходство с представителями

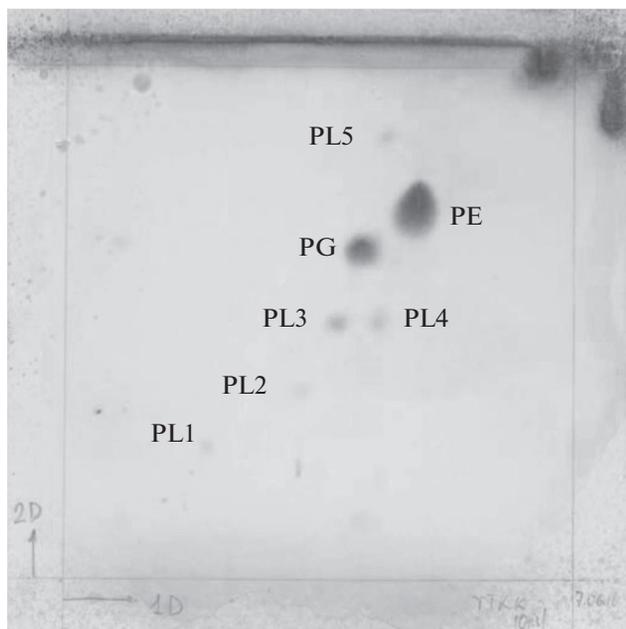


Рис. 2. Полярные липиды штамма ЛТК^T после разделения двумерной тонкослойной хроматографией: фосфатидилглицерол (PG); фосфатидилэтаноламин (PE); неидентифицированные фосфолипиды (PL1–5).

Таблица 2. Активности ферментов первичного и промежуточного метаболизма в экстрактах клеток штамма ЛТК^T, выращенного на метаноле

Фермент	Кофактор	Активность, нмоль/мин мг белка
Метанолдегидрогеназа	ФМС	1885
Формальдегиддегидрогеназа	ФМС	62
	НАД ⁺	16
Формиатдегидрогеназа	ФМС	57
	НАД ⁺	0
Гидроксипируватредуктаза	НАДН	0
	НАДФН	0
Серин-глиоксилатаминотрансфераза	НАДН	0
	НАДФН	0
Гексулозофосфатсинтаза		116
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	НАД ⁺	173
	НАДФ ⁺	139
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	НАД ⁺	138
	НАДФ ⁺	110
2-Кето-3-дезоксиглюконалальдолаза		27
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза		0
Рибулособисфосфаткарбоксилаза		0
Глутаматдегидрогеназа	НАДН	0
	НАДФН	0
Глутаматсинтаза	НАДН	0
	НАДФН	18
Глутаминсинтетаза	АТФ, Мп ²⁺	594

Примечание. Указаны средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала $\pm 5\%$), ФМС – феназинметосульфат.

рода *Methylophilus*: 99.6% с *M. leisingeri* DM11^T и 99.4% с *M. flavus* Ship^T (рис. 3). По данным тепловой денатурации содержание Г + Ц в ДНК штамма ЛТК^T составило 51.2 мол. %. Уровень ДНК–ДНК гомологии между штаммом ЛТК^T и *M. leisingeri* DM11^T, и *M. flavus* Ship^T составил 47 и 40% соответственно. По данным секвенирования фрагмента гена большой субъединицы метанолдегидрогеназы *mxaF* штамм ЛТК^T имеет 99.4% сходства аминокислотных последовательностей с *Methylophilus glucosoxydans* В^T (рис. 4).

Для определения генотипических различий между штаммом ЛТК^T и *M. leisingeri* DM11^T, и *M. flavus* Ship^T использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ) (рис. 5). Результаты RAPD-анализа показали, что штаммы ЛТК^T, DM11^T и Ship^T имеют различные паттерны продуктов амплификации, что свидетельствует о том, что штаммы представляют собой отдельные виды.

Дифференцирующие характеристики нового вида представлены в табл. 3.

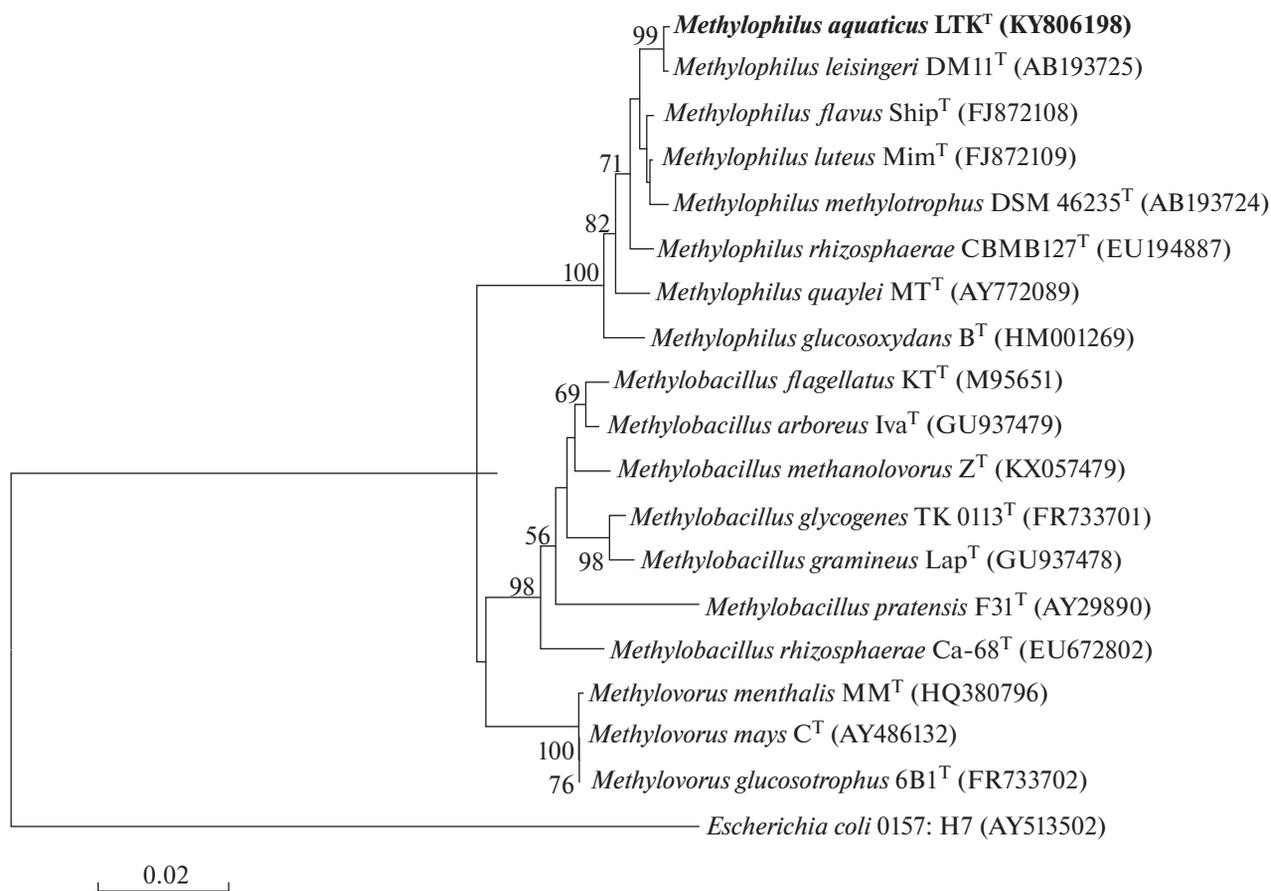


Рис. 3. Филогенетическое положение штамма ЛТК^T, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод “neighbor-joining”. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Таким образом, штамм ЛТК^T, выделенный из пресного водоема, является ограниченно-факультативным метилотрофом, реализующим КДФГ-вариант рибулозомонофосфатного пути C₁-метаболизма. Использует в качестве источников углерода и энергии метанол и фруктозу, не образует ацетонин в отличие от облигатного метилотрофа *M. flavus* Ship^T; но в отличие от *M. leisingeri* DM11^T не растет на дихлорметане и дибромметане; не имеет активности уреазы, в составе жирных кислот содержит 1.3% C_{17:1ω8}, отсутствующей в клетках штамма DM11^T, но не имеет C_{19:0cyc}, характерной для *M. leisingeri* DM11^T (1.1%). Согласно результатам RAPD-анализа, профиль продуктов случайной амплификации ДНК штамма ЛТК^T отличается от таковых у штаммов DM11^T и Ship^T количеством полос и их молекулярной массой.

На основании исследования фено- и генотипических признаков штамм ЛТК^T отнесли к новому виду рода *Methylophilus* — *Methylophilus aquaticus* sp. nov.

Onucanie Methylophilus aquaticus sp. nov.

Methylophilus aquaticus (a.qua'ti.cus. L. masc. adj. *aquaticus*, живущий, растущий или находящийся в воде, водный).

Грамотрицательные, неспорообразующие неподвижные палочки (0.35–0.45 × 1.8–2.2 мкм), размножается бинарным делением. На минеральной среде с метанолом колонии точечные, менее 1 мм в диаметре, бесцветные с выпуклым профилем, ровным краем, однородной структурой. Строгий аэроб, образует каталазу и оксидазу. Уреазу не образует. Активности β-галактозидазы, орнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы отсутствуют. Оптимально растет при 28–30°C и рН 7.5–8.0 в присутствии 0–0.05% (в./об.) NaCl. Растет на метаноле и фруктозе. Не растет в атмосфере H₂/O₂/CO₂, метана, на средах с пептоном и дрожжевым экстрактом, дихлорметане, метилированных аминах, этаноле, глюкозе, галактозе, мальтозе, маннозе, трегалозе, рибозе, сахарозе, раффинозе, органических кислотах и аминокислотах. В качестве источников азота использует

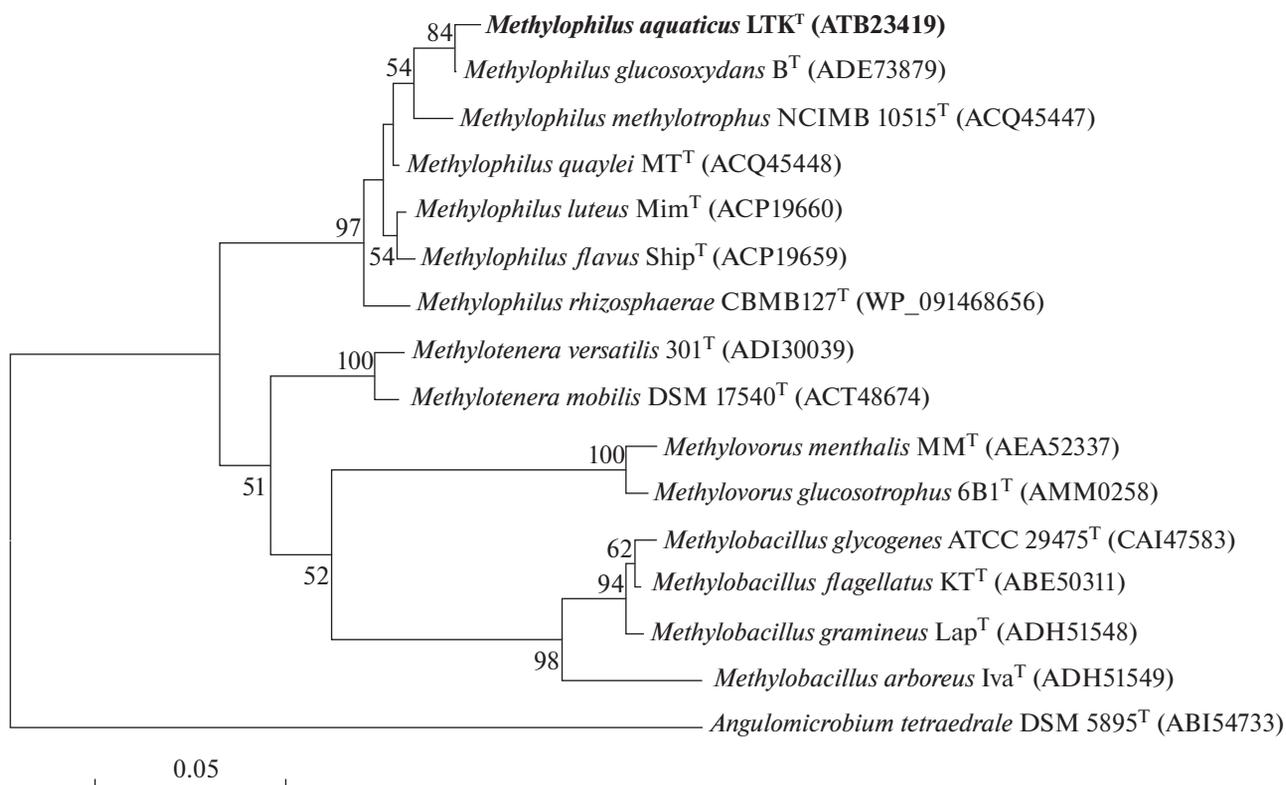


Рис. 4. Филогенетическое положение штамма LTK^T на основе сравнения аминокислотных последовательностей белка MxaF среди представителей *Betaproteobacteria*. Шкала соответствует 5 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод “neighbor-joining”. Корень определяли путем включения последовательности *Angulomicrobium tetradrale* DSM 5895^T (ABI54733) в качестве внешней группы.

нитраты и аммоний. Синтезирует индолы из триптофана на среде, содержащей нитраты в качестве источников азота. Желатин не разжижает, не выделяет сероводород. Ацетоин не образует. Не нуждается в витаминах и ростовых факторах. Реализует КДФГ-вариант рибулозомонофосфатного пути C₁-метаболизма. Аммоний ассимилирует посредством системы ферментов глутаматного цикла (глутаматсинтазы/глутаминсинтазы). Устойчив к действию линкомицина, пенициллина, хлорамфеникола, эритромицина. Чувствителен к гентамицину, стрептомицину, оксацилину, неомицину, налидиксовой кислоте, тетрациклину, новобиоцину, канамицину, ампициллину. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{16:0} (43.9%) и C_{16:1ω7c} (53.0%) кислоты. Основной убихинон – Q₈. В фосфолипидном составе клеток преобладают фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин; дифосфатидилглицерин отсутствует. Содержание Г + Ц пар в ДНК штамма LTK^T составляет 51.2 мол. % (T_{пл}).

Типовой штамм LTK^T (= VKM В-3159^T = JCM 32032^T = CCUG 70602^T) изолирован из пресного водоема в окрестностях г. Гурзуф, республика

Крым (Россия). Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма LTK^T депонированы в GenBank под номерами KY806198 и KY807768 соответственно.

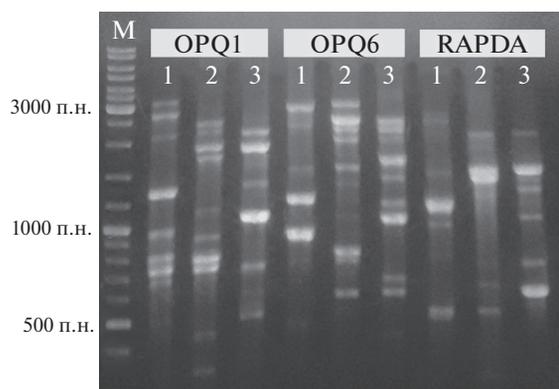


Рис. 5. RAPD-анализ продуктов амплификации *M. aquaticus* LTK^T (1), *M. leisingeri* DM11^T (2) и *M. flavus* Ship^T (3) с использованием праймеров OPQ1, OPQ6 и RAPDA. М – маркер молекулярных масс (GenRuler DNA Ladder Mix, “Thermo Scientific”, США).

Таблица 3. Основные характеристики, дифференцирующие виды рода *Methylophilus*

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8
Подвижность	–	–	–	–	+	–	–	+
Окраска колоний	Белые	Бледно-розовые	Желтые	Желтые	Серовато-белые	Белые	Белые	Белые
Тип митогтрофии	ОФ	ОФ	О	ОФ	ОФ	О	ОФ	ОФ
Ростовые субстраты								
Метиламин	–	–	–	–	+	–	+	–
Диметиламин	–	–	–	–	+	–	–	–
Триметиламин	–	–	–	–	+	–	+	–
Дихлорметан	–	+	–	–	–	–	+	–
Глюкоза	–	+	–	+	+	–	–	+
Фруктоза	+	–	–	–	–	–	+	–
Уреаза	–	+	–	–	+	+	Н.о.	–
Образование ацетона	–	–	+	+	–/+	Н.о.	Н.о.	–
Нитратредукция	–	Н.о.	–	–	Н.о.	+	+	+
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза	–	–	+	+	–	–	Н.о.	–
Оптimum температур, °С	28–30	30–35	19–24	24–26	30–37	25–29	28	28–30
Оптimum pH	7.5–8.0	6.8–7.2	7.2–7.8	7.2–7.8	6.5–7.2	6.5–7.5	6.8	7.0–7.6
Г + Ц ($T_{пл}$), мол. %	51.2	50.2	50.7	54.5	50.3	54.0	47.9	52.6
Источник выделения	Вода прес-ного водоема	Сточные воды	Филлосфера (<i>R. cinnamomea</i> L.)	Филлосфера (<i>T. farfara</i> L.)	Активный ил	Контаминант <i>Methylocystis methanolicus</i>	Ризосфера риса (<i>Oryza sativa</i> L.)	Ризосфера риса (<i>Oryza sativa</i> L.)

Примечание. О – облигатные, ОФ – ограниченно-факультативные; н.о. – не определяли. 1 – *M. aquaticus*; 2 – *M. leisingeri* (Доронина, Троценко, 1994); 3 – *M. flavus* (Gogleva et al., 2010); 4 – *M. luteus* (Gogleva et al., 2010); 5 – *M. methylophilus* (Jenkins et al., 1987); 6 – *M. quaylei* (Doronina et al., 2005); 7 – *M. rhizospherae* (Madhaiyan et al., 2009); 8 – *M. glaucosaxudans* (Doronina et al., 2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Доронина Н.В., Говорухина Н.И., Лысенко А.М., Троценко Ю.А. Анализ ДНК–ДНК гомологии у облигатно-метилотрофных бактерий // Микробиология. 1988. Т. 57. №4. С. 629–633.
- Doronina N.V., Govorukhina N.I., Lysenko A.M., Trotsenko Y.A. Analysis of DNA–DNA homology in obligately methylotrophic bacteria // Microbiology (Moscow). 1988. V. 57. P. 509–513.
- Доронина Н.В., Троценко Ю.А. *Methylophilus leisingerii* sp. nov. – новый вид ограниченно-факультативных метилотрофных бактерий // Микробиология. 1994. Т. 63. № 3. С. 530–537.
- Doronina N.V., Trotsenko Yu.A. *Methylophilus leisingerii* sp. nov., a new species of restricted facultatively methylotrophic bacteria // Microbiology (Moscow). 1994. V. 63. P. 298–302.
- Balachandar D., Raja P., Sundaram S.P. Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants // Braz. J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 68–73.
- Beck D.A., McTaggart T.L., Setboonsarng U., Vorobev A., Kalyuzhnaya M.G., Ivanova N., Goodwin L., Woyke T., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. The expanded diversity of *Methylophilaceae* from Lake Washington through cultivation and genomic sequencing of novel ecotypes // PLoS One. 2014. V. 9. e102458.
- Collins M.D. Analysis of isoprenoid quinones. Methods in Microbiology. Ed. Gottschalk G. New York: Acad. Press, 1985. V. 18. P. 329–366.
- Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V. *Methylophilus quaylei* sp. nov., a new aerobic obligately methylotrophic bacterium // Syst. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 303–309.
- Doronina N.V., Gogleva A.A., Trotsenko Y.A. *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylotroph from rice rhizosphere // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 196–201.
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A. The family *Methylophilaceae* // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 2014. P. 869–880.
- Gogleva A.A., Kaparullina E.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. *Methylophilus flavus* sp. nov. and *Methylophilus luteus* sp. nov., aerobic, methylotrophic bacteria associated with plants // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2623–2628.
- Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. V. 26. P. 192–195.
- Jenkins O., Byrom D., Jones D. *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 446–448.
- Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425–431.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics. Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- McDonald I.R., Murrell J.C. The methanol dehydrogenase structural gene *mxhA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 3218–3224.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kwon S.W., Sa T.M. *Methylophilus rhizosphaerae* sp. nov., a restricted facultative methylotroph isolated from rice rhizosphere soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2904–2908.
- Owen R.J., Lapage S.P. The thermal denaturation of partly purified bacterial deoxyribonucleic acid and its taxonomic applications // J. Appl. Bacteriol. 1976. V. 41. P. 335–340.
- Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.
- Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Govorukhina N.I. Metabolism of non-motile obligately methylotrophic bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 3. P. 293–297.
- Wellner S., Lodders N., Glaeser S. P., Kämpfer P. *Methylobacterium trifolii* sp. nov. and *Methylobacterium thuringiense* sp. nov., methanol-utilizing, pink-pigmented bacteria isolated from leaf surfaces // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 2690–2699.

Methylophilus aquaticus sp. nov., a New Aerobic Methylotrophic Bacterium Isolated from a Freshwater Environment

E. N. Kaparullina^{1,*}, N. V. Agafonova¹, Yu. A. Trotsenko¹, and N. V. Doronina¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia
*e-mail: lenokap80@gmail.com

Received March 15, 2018

Abstract—A new restricted facultative methylotroph, strain LTK^T, isolated from the water of a small freshwater reservoir, was found to carry out the KDPG variant of the ribulose monophosphate pathway of C₁ metabolism. The cells of the isolate were aerobic, gram-negative, non-spore-forming, nonmotile rods reproducing by binary fission. The isolate was mesophilic and neutrophilic; it synthesized indole derivatives. Hexadeca-

noic (C_{16:0}) and *cis*-9-hexadecenoic (C_{16:1 ω 7}) acids were the major fatty acids, and Q₈ was the major ubiquinone. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol were the dominant phospholipids, while diphosphatidylglycerol was not present. Activities of α -ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase were not revealed. Ammonium was assimilated via the enzyme system of the glutamate cycle. The 16S rRNA gene sequence of strain LTK^T exhibited high similarity to those of *Methylophilus* species: 99.6% to *M. leisingeri* DM11^T and 99.4% to *M. flavus* Ship^T. DNA–DNA homology between strain LTK^T and *M. leisingeri* DM11^T and *M. flavus* Ship^T was 47 и 40%, respectively. Based on these data, strain LTK^T was assigned to the new species, *Methylophilus aquaticus* sp. nov. (= VKM B-3159^T = JCM 32032^T = CCUG 70602^T).

Keywords: *Methylophilus aquaticus* sp. nov., aerobic methylotroph, ribulose monophosphate pathway

СТРУКТУРА МИКРОБНЫХ МАТОВ В ПРИБРЕЖНЫХ РАЙОНАХ МРАМОРНОЙ БУХТЫ (КРЫМСКИЙ ПОЛУОСТРОВ)

© 2018 г. Н. В. Пименов^{a, *}, А. Ю. Меркель^a, И. Ю. Тарновецкий^b, Т. В. Малахова^c, О. С. Самылина^a, Т. А. Канапацкий^a, Е. Н. Тихонова^a, М. А. Власова^a

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^cИнститут морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия

*e-mail: npimenov@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2018 г.

Проведены исследования структуры микробных матов, обнаруженных в районе Мраморной бухты Крымского полуострова. С использованием световой, электронной и сканирующей электронной микроскопии установлено, что основу бактериальных матов составляет сеть из переплетающихся тонких нитей диаметром от 100 до 500 нм, состоящих преимущественно из серы. В мате выявлены также многочисленные одиночные клетки микроорганизмов, имеющих бобовидную форму и размеры $\sim 1.6 \times 0.7$ мкм, часть из которых прикреплена к серным нитям. По результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК установлено, что в образце бактериальных матов доминируют бактерии родов *Arcobacter* (27%), *Alcaligenes* (17%), *Desulfuromonas* (8.5%) и некультивируемые бактерии семейства *Lachnospiraceae* (4.9%). В образце детрита, подстилающего бактериальные маты, не было обнаружено явно доминирующего таксона микроорганизмов. В детрите, как и в бактериальном мате, преобладали бактерии родов *Arcobacter* и *Desulfuromonas*, но их относительная численность была значительно ниже, 4.1 и 6% соответственно. Анализ последовательностей гена 16S рРНК, специфичных для рода *Arcobacter*, выявил значительное филогенетическое разнообразие этой группы в образцах как поверхностных бактериальных матов, так и детритного осадочного отложения. Большинство полученных последовательностей образовывали общие кластеры с последовательностями различных некультивируемых представителей рода *Arcobacter* и лишь незначительная часть оказалось близкородственной недавно описанной сульфидоксилирующей бактерии “*Candidatus Arcobacter sulfidicus*”. Таким образом, доминантной компонентой исследованных нами микробных сообществ Мраморной бухты являются микроорганизмы филогенетически разнородной группы эpsilon-протеобактерий рода *Arcobacter*.

Ключевые слова: микробные маты, серные нити, сероокисляющие микроорганизмы, *Arcobacter*, высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК

DOI: 10.1134/S0026365618050142

В восьмидесятых годах прошлого столетия были собраны доказательства биогенного происхождения основной части сероводорода в самом крупном в мире меромиктическом водоеме — Черном море (Ivanov, Lein, 2006). Особенности гидрологии Черного моря и ограниченный водообмен привели к тому, что большая часть черноморских вод и осадочных отложений не содержит кислорода и обогащена восстановленными газами биогенного происхождения — сероводородом и метаном (Sorokin, 1983; Jørgensen et al., 1991; Reeburgh et al., 1991). В глубоководной зоне проникновение кислорода ограничивается верхними 100 м, на периферии окисленный слой составляет 150–180 м, и только в мелководных прибрежных районах шельфа кисло-

родные воды распространяются до дна. Окисленный верхний слой мелководных осадочных отложений составляет, как правило, не более 5–10 см (Lein et al., 2002). Быстрое исчерпание кислорода в осадках объясняется тем, что шельф Черного моря относится к высокопродуктивной зоне с высокими интенсивностями как продукции, так и деструкции органического вещества (ОВ). Для морских водоемов установлено, что сульфатредуцирующие прокариоты играют основную роль на конечной стадии разложения ОВ (Jørgensen, 1982). В процессе жизнедеятельности микроорганизмов этой филогенетически разнородной группы прокариот происходит окисление низкомолекулярных органических веществ с одновременным восстановлением сульфат-

иона поровых вод осадков до сероводорода и сульфидов. Обогащенные ОВ осадки морских водоемов характеризуются высокими скоростями процесса сульфатредукции (СР), что при отсутствии достаточного количества железа и других металлов, а также при значениях $pH \leq 7$, способствует накоплению в подповерхностных восстановленных илах значительного количества свободного сероводорода. H_2S мигрирует к поверхности осадков и часто становится причиной формирования полей бактериальных матов, осуществляющих процесс окисления сероводорода и покрывающих значительные площади осадочных отложений. Такие процессы происходят, например, в прибрежных донных осадках залива Уолфиш-Бей в Намибии, где выявлены масштабные поля микробных матов, образованных крупными шаровидными бактериями рода *Thiomargarita*, клетки которых могут достигать 0.75 мм в диаметре (Schulz et al., 1999). Огромные площади поверхностных прибрежных осадков западного побережья Латинской Америки заселены нитчатые бактериями рода *Thioploca*, которые, как и представители рода *Thiomargarita*, окисляют кислородом или нитратом сероводород и другие восстановленные соединения серы, поступающие из анаэробной осадочной толщи (Fossing et al., 2002). На поверхности минералов и осадочных отложений в районах разгрузки глубоководных вулканов, холодных метановых сипов и подводных гидротерм также часто встречаются микробные обрастания и маты, образованные представителями еще одного рода бесцветных серобактерий, *Beggiatoa*, растущих хемолито- или хемоорганотрофно на восстановленных соединениях серы с внутриклеточным накоплением элементной серы, придающей скоплению этих микроорганизмов характерный беловато-желтоватый цвет (Пименов и соавт., 2000; Niemann et al., 2006; Lloyd et al., 2010; McKay et al., 2012).

В Черном море микробные обрастания поверхностных осадков выявлены на свале глубин северо-западного шельфа у нижней кромки сероводородных вод (глубина 110–200 м), где по данным световой микроскопии и секвенирования гена 16S рРНК основу бактериальных матов составляют нитчатые серные бактерии, филогенетически близкие роду *Beggiatoa* (Jessen et al., 2016). Под слоем матов располагались обогащенные ОВ осадки с высокой интенсивностью сульфатредукции. Глубже в сероводородной зоне Черного моря были обнаружены микробные маты, формирующиеся в районе выходов струйных газовыделений метана (Пименов и соавт., 1997; Michaelis et al., 2002; Treude et al., 2007). В этих матах доминировали метанотрофные археи групп ANME-1 и ANME-2, обеспечивающие анаэробное окисление метана в консорциуме с сульфатредуцирующими бактериями.

Несмотря на достаточно подробные исследования разнообразия микробных матов в Черном море, обрастания осадков прибрежной мелковод-

ной зоны до сих пор остаются малоизученными. В наших предыдущих работах, мы зафиксировали развитие в летний период слабых микробных обрастаний на поверхности осадочных отложений в Херсонесской бухте Гераклеийского полуострова (Малахова и соавт., 2015). Чаще всего такие обрастания располагались непосредственно в зонах метановых газовыделений, которые широко распространены в прибрежной зоне Крымского полуострова (Егоров и соавт., 2012). Отмечено, что к концу гидрологического лета (сентябрь) площадь покрытия таких матов значительно увеличивается. Под слоем бактериальной пленки обычно располагаются сильно восстановленные осадки, обогащенные сероводородом и метаном, с повышенной (относительно фоновых осадков) скоростью сульфатредукции и метаноокисления. На основании микроскопических исследований, выявивших на поверхности осадков спирохетообразные нитчатые клетки бактерий, было сделано предположение, что беловатые бактериальные обрастания формируются микробным сообществом типа "*Thiodendron*" (Малахова и соавт., 2015).

Молекулярно-биологический анализ поверхностных осадков с бактериальными обрастаниями, основанный на определении последовательностей гена *dsrB* (окислительного типа), выявил их наибольшее сходство (90–99%) с последовательностями соответствующего гена представителей сероокисляющих бактерий родов *Thiocapsa*, *Thiobaca*, *Thioflavicoccus* и *Thiorhodococcus*. Детектировать хемолитотрофные нитчатые серобактерии не удалось (Брюханов и соавт., 2018).

В этой связи нами были продолжены поиск и исследования бактериальных матов в прибрежной зоне мелководных осадков Крымского полуострова. Целью работы было выявить особенности локализации бактериальных матов на поверхности дна прибрежных районов Мраморной бухты, определить их приуроченность к газонасыщенным осадкам и метановым сипам, а также детектировать на основании секвенирования гена 16S рРНК доминирующие микроорганизмы и их трофическую специализацию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание места отбора проб. В августе 2017 г. восточнее Мраморной бухты (44°29'51.7" N; 33°31'41.7" E) на глубине 6 м была обнаружена новая площадка пузырьковых газовыделений и сопутствующие ей бактериальные маты. Пузырьковый газ выделялся из песчано-галечных отложений. Район исследований расположен в пределах Караньского блока (Иванов и соавт., 2009). Геологические границы Караньского блока контролируются глубинными разломами и разломами глубокого заложения. Одним из наиболее крупных тектонических нарушений является крупный

разлом субширотного направления – Централь-но-Балаклавский сдвиг. Мраморная балка, западная граница Караньского блока, представляет собой хорошо проявленный в рельефе овраг и является частью Георгиевского разлома – одной из структур, обрамляющих зону глубинного Крымского тектонического нарушения. Поверхность известняков в районе исследования была сильно изъязвлена многочисленными небольшими углублениями, образовавшимися, вероятно, в процессе абразии. В этих углублениях мы фиксировали детритные отложения, верхний слой которых был покрыт белыми бактериальными обрастаниями (матами). Прецизионный отбор проб бактериальных матов и подстилающих осадков проводил водолаз при помощи шприца объемом 5 мл. В качестве фоновых проб донных осадков были выбраны районы близкие к местам выхода газа, но без признаков струйных газовыделений и бактериальных пленок.

Световая и электронная микроскопия. Образцы мата, отобранные для световой и электронной микроскопии, фиксировали глутаральдегидом (0.5 мл 25% ГА на 5 мл пробы) или вносили этиловый спирт до конечной концентрации 50%. Далее образцы транспортировали в лабораторию, где готовили препараты для световой и электронной микроскопии.

Прямой микроскопический анализ образцов, фиксированных глутаральдегидом, проводили при увеличении $\times 1000$ на микроскопе Axio Imager.M2 (“Carl Zeiss”, Германия) с цифровой камерой AxioCam 503 mono и компьютерным программным обеспечением Zen blue 2012.

Тотальные препараты для электронной микроскопии готовили следующим образом: образцы бактериальных обрастаний объемом 25 мкл наносили на медные сетки с формваровой подложкой,

укрепленной углеродом, и выдерживали в течение 1 мин. Жидкость удаляли фильтровальной бумагой. После этого на сеточку наносили 25 мкл 2% раствора фосфорновольфрамовой кислоты и выдерживали в течение 30 с. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Сетки подсушивали на воздухе. Тотальные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM 100CXII (“Jeol”, Япония) при напряжении 80кВ.

Исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с применением рентгеноспектрального микроанализа (РСМА), позволяющего проводить полуколичественный элементный анализ участков микронного и меньшего размеров, проводили на электронном микроскопе EVO-50 Zeiss с микроанализатором INCA Oxford 350 (Великобритания) в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН. Для этого фиксированные этиловым спиртом образцы наносили на покрывное стекло, высушивали на воздухе, после чего напыляли золотом и анализировали в сканирующем микроскопе.

Определение состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Для анализа состава микробного сообщества методом высокопроизводительного секвенирования было отобрано три пробы: поверхностные бактериальные обрастания, детритные отложения непосредственно под обрастаниями и использованный в качестве контроля заиленный песок, отобранный на расстоянии не менее 20 м от бактериальных обрастаний и высачиваний газа. После отбора пробы помещали в 2 мл пробирки и центрифугировали 5 мин при 14000 g. Супернатант сливали, к осадку добавляли раствор, содержащий 0.15 М NaCl и 0.1 М Na₂ЭДТА в соотношении 1 : 1. В таком виде образцы транспортировали в лабораторию при температуре 4–10°С. Для вы-



Рис. 1. Бактериальные маты в районе бухты Мраморная балка.

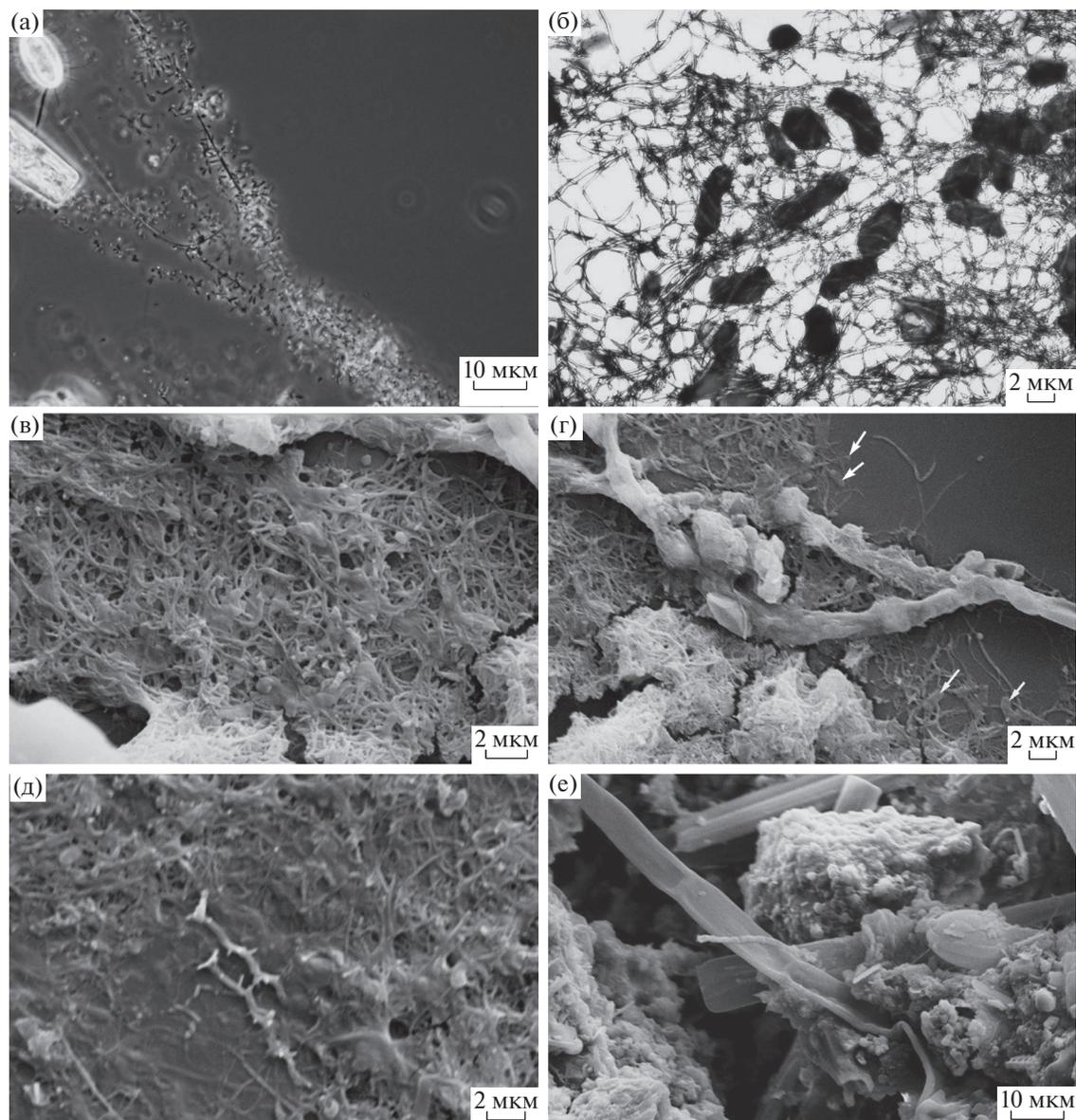


Рис. 2. Микрофотографии образца микробного мата с хорошо различимой плотной сетью из тонких нитей и бобовидными клетками, морфологически близкими к *Arcobacter*: а – световая микроскопия (фазовый контраст); б – электронная просвечивающая микроскопия, тотальный препарат; в–д – СЭМ, клетки *Arcobacter* отмечены стрелками; е – СЭМ, микрофотография детритных отложений, подстилающих мата.

деления ДНК использовали механическое и химическое разрушение клеток (Lever et al., 2015). Для разрушения клеток к 500 мкл пробы, полученной на предыдущем этапе, добавляли гуанидин гидрохлорид и Тритон X-100 до конечной концентрации 800 мМ и 0.5% соответственно и смесь стеклянных бус диаметром 425–600 мкм и менее 106 мкм (объем ~500 мкл). Пробы гомогенизировали на FastPrep®-24 Instrument (“MP Biomedicals”, США) в течение 40 с на скорости 6 м/с и инкубировали 50 мин при 50°C. Далее проводили стандартную процедуру фенол-хлороформной экстракции и осаждения нуклеиновых кислот в изопропанол. Библиотеки на основе

V3–V4 региона гена 16S рРНК были приготовлены в соответствии с ранее описанной методикой (Fadrosh et al., 2014). Для получения ампликонов использовали следующую систему праймеров: прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT XXXXXXXXXXXXX ZZZZ CCTAYGGGDBGCWSCAG-3'), состоящий, соответственно, из “5' Illumina Linker Sequence”, “Index 1”, “Heterogeneity Spacer” (Fadrosh et al., 2014) и Pro-mod-341F праймерной последовательности (Merkel et al., 2017); обратный праймер (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

Таблица 1. Результаты секвенирования и оценка альфа разнообразия

Образец	Количество прочтений	ОТЕ бактерий	ОТЕ архей	Относительное количество архей, %	Неклассифицированные прочтения, %	Chao1	Насыщение, %	Shannon
Поверхностные обрастания	193558	2603	38	0.6	3.3	2989	88.4	6.8
Детрит	170095	4132	57	6.5	4.9	4811	87	8.5
Контроль	224068	8157	245	1.1	0.7	9199	91.3	9.8

XXXXXXXXXXXX ZZZZ GACTACNVGGGT-MTCTAATCC-3'), состоящий из "3' Illumina Linker Sequence", "Index 2", "Heterogeneity Spacer" и Pro-mod-805R праймерной последовательности (Merkel et al., 2017) соответственно. Полученные ампликоны разделяли в 2% агарозном геле с помощью электрофореза, вырезали из геля скальпелем и очищали при помощи набора Cleanup Standard ("Евроген", Россия). Секвенирование проводили на системе MiSeq ("Illumina", США) с использованием набора реагентов, обеспечивающего длину прочтения 300 нуклеотидов с каждого конца ампликона. Демультимплексирование проводили при помощи соответствующих скриптов ПО QIIME версии 1.9.0 (Caporaso et al., 2010). Последующую обработку и анализ последовательностей также проводили в QIIME ver. 1.9.0. Данные были пропущены через фильтр с минимальным качеством прочтения нуклеотида 30 и минимальной длиной прочтения 350 п.о. Проверку прочтений на химерность проводили с помощью скрипта identify_chimeric_seqs.py по алгоритму USEARCH версии 6.1544 (Edgar, 2010) и референсной базой прочтений 16S рРНК Silva 123 (Quast et al., 2013). Формирование таблицы ОТЕ производили с помощью скрипта pick_open_reference_otus.py. Последовательности группировали в ОТЕ с уровнем сходства 97% (Schloss, Nan-

delsmann, 2006), используя алгоритм USEARCH версии 6.1544 (Edgar, 2010) и референсную базу прочтений 16S рРНК Silva 123 версии (Quast et al., 2013). Анализ альфа разнообразия и построение кривых насыщения производили с помощью скрипта core_diversity_analyses.py для нормализованной выборки в 170000 прочтений на образец.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В Мраморной бухте на глубине 6 м в непосредственной близости от струйных газовыделений метана (на расстоянии около 1 м) мы наблюдали белые бактериальные маты, имевшие хлопковидную структуру (рис. 1). Они были достаточно четко локализованы в пространстве, площадь одного пятна не превышала 0.25 м². Под верхним тонким слоем белых обрастаний располагалось большое количество детрита и обрывков тканей произрастающих здесь макрофитов (в основном *Cystoseira* sp.).

Микроскопический анализ структуры матов. С использованием световой микроскопии были выявлены необычные скопления клеток в образце бактериальных матов (рис. 2а). Палочкообразные слегка изогнутые клетки, часто соединенные в цепочки по 2–3, группировались вокруг тонкой нити, образуя подобие гирлянды.

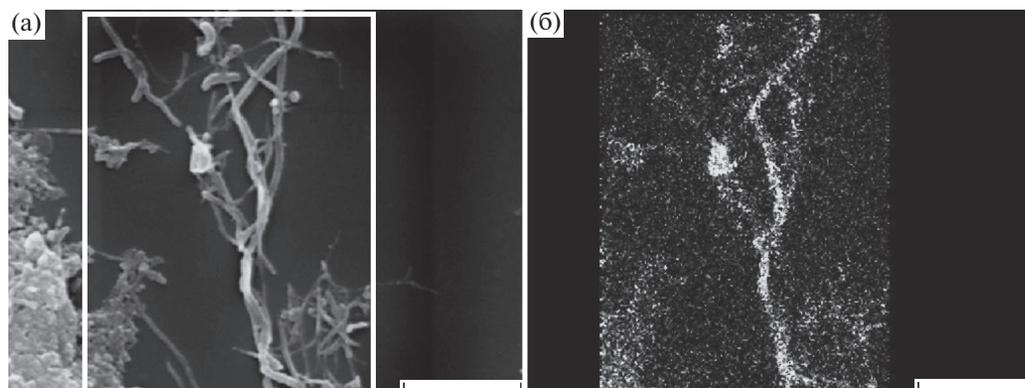


Рис. 3. Рентгеноспектральный микроанализ (РСМА) элементного состава тонких нитей (образец наилка, фиксированный этанолом): а – СЭМ микрофотография; б – карта распределения серы (белый цвет). Масштабная метка – 5 мкм.

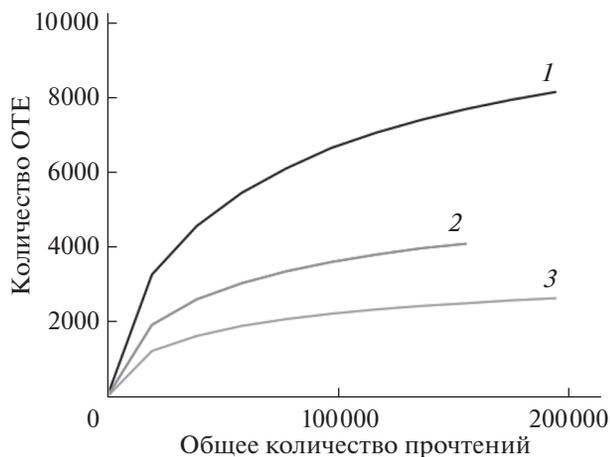


Рис. 4. Соотношение общего количества полученных последовательностей гена 16S рРНК к количеству полученных операционных таксономических единиц (ОТЕ), сформированных на уровне сходства 97%.

Электронно-микроскопическое изображение тотального препарата, полученного из образца этих матов, представлено на рис. 2б. Хорошо видна сеть тонких разделенных на сегменты сильно ветвящихся нитей (ширина 0.05–0.1 мкм, длина варьирует в пределах 0.3–1.5 мкм), в местах прикрепления к клеткам покрытых слоем слизистого вещества. Клетки достаточно многочисленны, расположены в основном поодиночке. Морфологически клетки представлены палочками двух типов: длинные изогнутые длиной 1.7 и шириной 0.5 мкм и короткие округлые длиной 0.7 и шириной 0.5 мкм. Нити ассоциированы с клетками, прочно оплетая их со всех сторон, часть клеток связана с нитями стебельками, покрытыми слизью.

При исследовании образцов поверхностных бактериальных обрастаний на СЭМ также была обнаружена плотная сеть из переплетающихся тонких нитей диаметром от 100 до 500 нм (рис 2в, 2г). С использованием РСМА показано, что эти нити состоят преимущественно из серы (рис. 3). Местами видно, как к серным нитям крепятся микроорганизмы, имеющие бобовидную форму и размеры $\sim 1.6 \times 0.7$ мкм (рис. 2г). Помимо этого, иногда встречаются извитые структуры, имеющие «основание» и «отростки» (рис. 2д). Длина этих структур 7.2–8.5 мкм, толщина — 0.5 мкм. Морфологически они могут быть интерпретированы как нити элементной серы на начальной стадии их образования микроорганизмами.

В образцах, подстилающих бактериальные маты, представленных детритными отложениями, переплетающихся нитей серы не обнаружено. На СЭМ видны минеральные илестые частицы, обломки панцирей диатомовых водорослей, оболочки нитчатых водорослей, а также нитчатые микроорганизмы (рис. 2е).

Молекулярный анализ состава микробного сообщества. В результате секвенирования было получено 587721 последовательности 16S рРНК со средней длиной 406 нуклеотидов. Покрытие разнообразия филоотипов, рассчитанное с помощью метода Chao1 (Chao, 1984), варьировало от 87 до 91.3% (табл. 1). Кривые соотношения общего количества полученных последовательностей гена 16S рРНК к количеству полученных ОТЕ для образцов из поверхностных бактериальных обрастаний и детритных отложений вышли на плато. В контрольном образце можно говорить о состоянии, близком к насыщению (рис. 4). Индекс Шэннона варьировал от 6.8 до 9.8 (табл. 1). Наибольшее разнообразие микроорганизмов было зафиксировано в контрольном образце. Умеренный показатель индекса Шэннона (6.8) для исследованного бактериального мата, в сравнении с контрольным образцом, свидетельствует о значительной специализации микробного сообщества мата и более высокой роли давления естественного отбора на формирование этого сообщества в сравнении с контрольным. Полученные прочтения были сгруппированы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне сходства 97%. Всего было получено 12126 уникальных ОТЕ. Большая часть ОТЕ была отнесена к бактериям. В образце поверхностных обрастаний (рис. 5а) преобладали бактерии родов *Arcobacter* (27%), *Alcaligenes* (17%), *Desulfuromonas* (8.5%) и некультивируемые бактерии семейства *Lachnospiraceae* (4.9%). В образце детрита не было явно доминирующего таксона микроорганизмов (рис. 5б). Здесь, как и в поверхностных обрастаниях, преобладали бактерии родов *Arcobacter* и *Desulfuromonas*, но их относительная численность была значительно ниже (4.1 и 6%). Другими многочисленными родами бактерий были *Marinobacterium* (3.6%), *Desulfuromusa* (3.4%), *Draconibacterium* (3.3%). В контрольном образце (рис. 5в) наиболее многочисленны были филогенетические кластеры некультивируемых бактерий «JTB255 marine benthic group» (10.6%) и «OM1 clade» (9.4%). Относительная численность архей была наибольшей в образце из детрита (6.5%). В нем преобладали представители родов *Methanogenium* (2.9%), *Methanoplanus* (1.4%) и *Methanomicrobium* (1.1%). В поверхностных обрастаниях и контрольном образце архей составляли лишь 0.6 и 1.1% от всего микробного сообщества. В поверхностных матах почти все археи были отнесены к филуму *Woesearchaeota* (0.5%). В контрольном образце были значительно представлены археи класса *Thermoplasmata* (0.3%), филума *Woesearchaeota* (0.2%), а также филума *Thaumarchaeota* (0.1%). 619 последовательностей архей (0.3%) нельзя было отнести ни к одному из известных филумов.

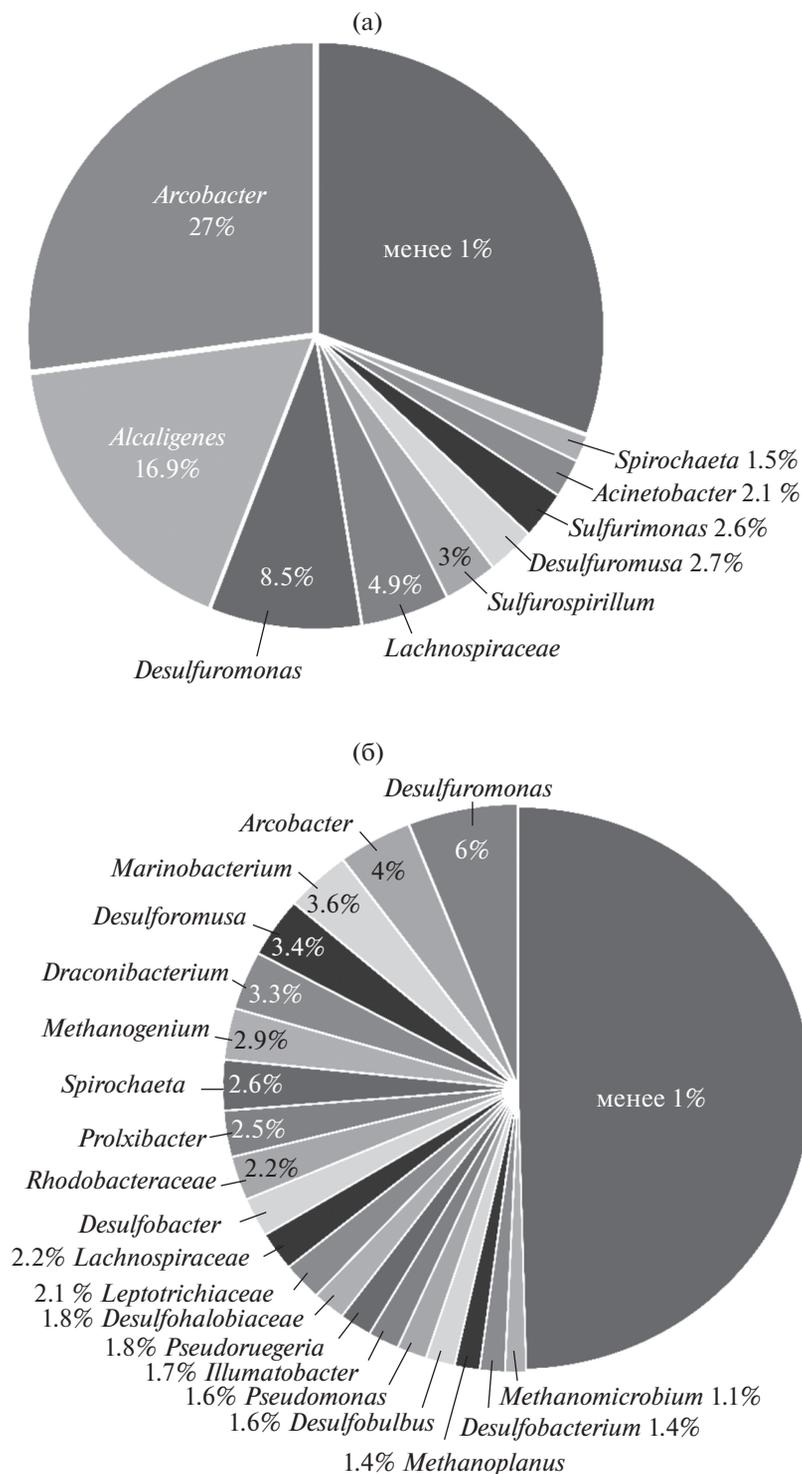


Рис. 5. Состав микробного сообщества: а – поверхностные обрастания; б – детрит; в – контроль. В разделе “менее 1%” находятся микроорганизмы, относительная численность которых не превысила 1%.

ОБСУЖДЕНИЕ

В Мраморной бухте мы впервые для прибрежной зоны Крымского полуострова обнаружили хорошо выраженные бактериальные маты, в которых микроскопическими и электронно-микро-

скопическими исследованиями были обнаружены многочисленные серные нити и микроорганизмы, морфологически сходные с эпсилон-протеобактериями рода *Arcobacter*. Подобные бактериальные маты с доминированием сульфидоокисляющих

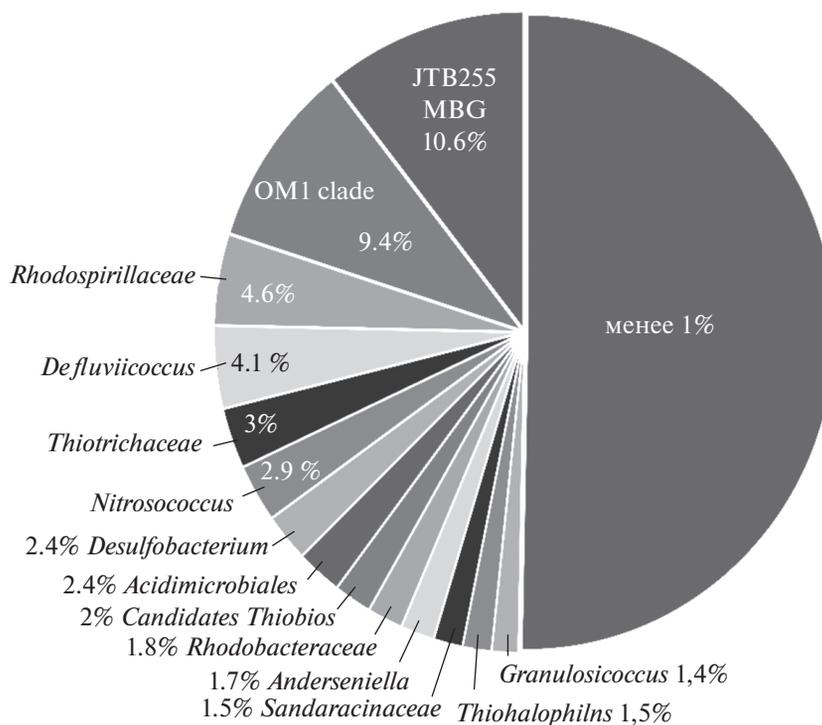


Рис. 5. Окончание

бактерий рода *Arcobacter* ранее выявлялись на подводных гидротермальных полях (Taylor et al., 1999) и грязевых вулканах (Omorgie et al., 2008; Grünke et al., 2011).

Значительный прогресс в изучении этой группы бактерий связан с исследованиями Вирсена и соавт. (Wirsen et al., 2002). В ходе своей работы по изучению прибрежных морских осадков они выделили и культивировали в лабораторных условиях новую подвижную сульфидоксилирующую бактерию (“*Candidatus Arcobacter sulfidicus*”), образующую при росте в микроаэрофильных условиях элементарную серу в виде длинных тонких нитей. Позднее С.М. Сивертом и соавт. (Sievert et al., 2007) было подробно исследовано формирование нитчатых образований серы этими микроорганизмами. На полученных нами фотографиях клеток бактериальных матов также удалось проследить скопления клеток и серные нити, морфологически сходные с описанными ранее (рис. 2). Результаты изучения образцов бактериальных матов в сканирующем микроскопе с рентгеноспектральным микроанализом подтвердили предположение о том, что основным компонентом многочисленных нитей является элементарная сера (рис. 3).

Данные секвенирования последовательностей гена 16S рРНК подтвердили гипотезу о домини-

ровании в бактериальных матах представителей рода *Arcobacter* (более 27%). Еще одним значимым компонентом бактериальных матов были представители рода *Desulfuromonas* (8.5%). Известно, что подвижные строго анаэробные бактерии рода *Desulfuromonas* встречаются в анаэробных осадках пресных и морских водоемов, где они используют низкомолекулярные органические соединения в качестве донора электронов и элементарную серу как акцептор электронов (Kuever et al., 2015). Присутствие этих микроорганизмов в составе бактериальных матов вполне предсказуемо, поскольку в матах имеется избыток необходимой для их роста элементарной серы. Образующийся при восстановлении серы сульфид-ион может снова использоваться бактериями *Arcobacter*, которые обеспечивают тем самым локальный круговорот серы в поверхностном слое осадков и препятствуют проникновению сероводорода в надосадочную водную толщу.

Анализ полученных последовательностей, отнесенных к роду *Arcobacter*, выявил значительную филогенетическую разнородность этой группы в образцах поверхностного бактериального обрастания и детритного осадочного отложения (рис. 6). Большинство выявленных последовательностей кластеризовалось с последовательностями различных некультивируемых представи-

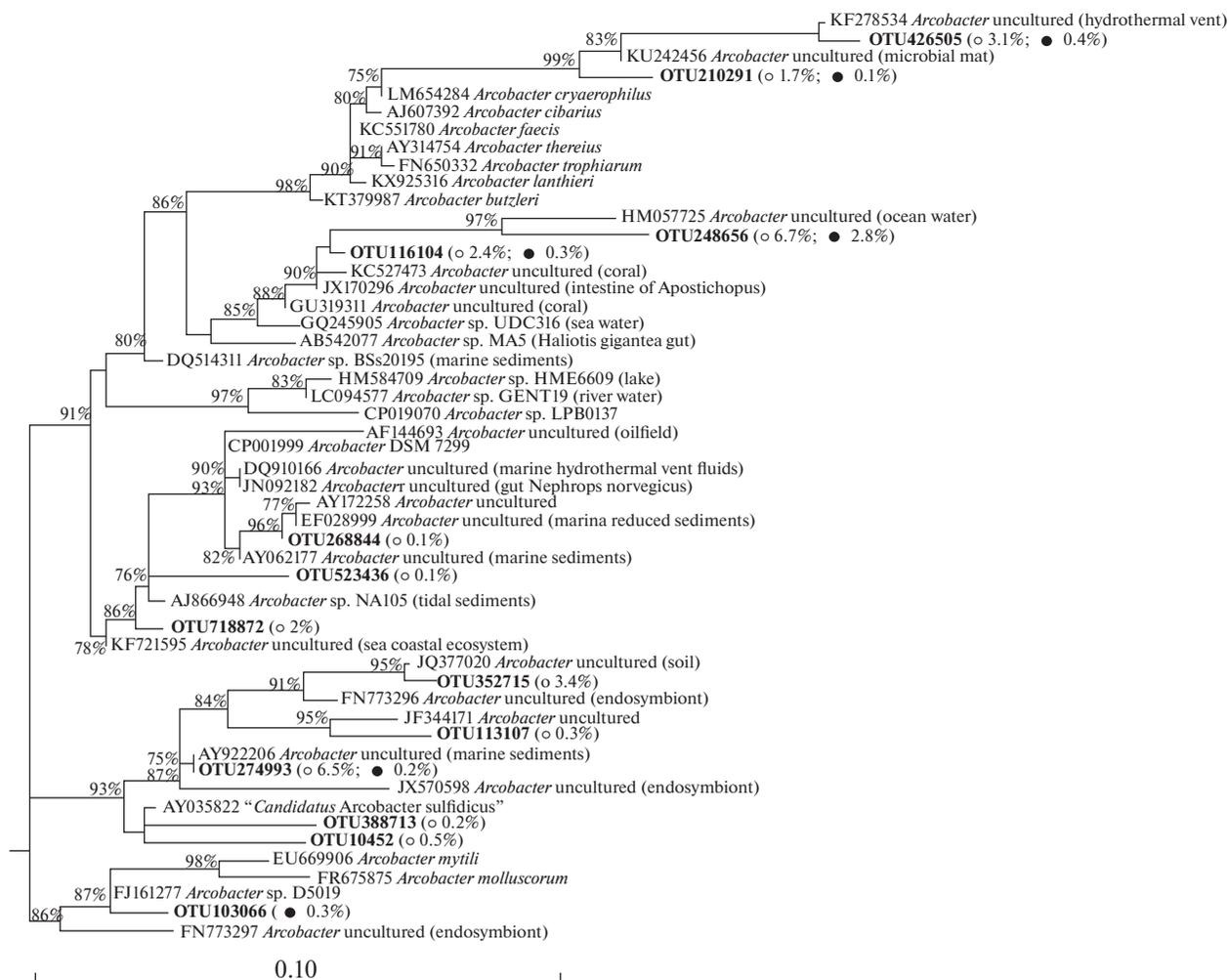


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей V3–V4 участка гена 16S рНК. Дерево построено в PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) с использованием алгоритма Approximate Likelihood-Ratio Test (Anisimova, Gascuel, 2006) для статистического анализа точек ветвления (значения ниже 75% не показаны). В скобках указано относительное содержание данной ОТЕ в микробном сообществе поверхностных бактериальных обрастаний (○) и детритных осадочных отложений (●). Для референсных последовательностей в скобках указано место обнаружения. В качестве корневой использовалась последовательность 16S рНК JFBL01000027 *Sulfurospirillum arcachonense* DSM 9755.

телей рода *Arcobacter* и лишь незначительная часть оказалась близкородственной недавно описанной сульфид окисляющей бактерии “*Candidatus Arcobacter sulfidicus*”. Таким образом, в исследованных микробных сообществах доминирует не один филотип рода *Arcobacter*, а целая разнообразная группа таких филотипов.

Еще одной доминирующей группой бактерий в матах был род *Alcaligenes* — это аэробные хемоорганогетеротрофные бактерии, широко распространенные в морских и пресных водоемах, способные расти на многих низкомолекулярных органических соединениях (Akagawa, Yamasato, 1989). Высокая численность этих бактерий может быть связана с достаточно высокой концентрацией лабильного органического вещества, образование которого может

являться как результатом жизнедеятельности хемолитотрофных сероокислителей *Arcobacter*, так и миграцией ОВ из подстилающих мат детритных осадочных отложений.

По нашим данным в слое детритных отложений значительно увеличивается разнообразие микроорганизмов, сообщество которых обеспечивает активное протекание деструкционных процессов. Наряду с широким спектром гидролитических хемогетеротрофных микроорганизмов здесь выявлено также присутствие разных сульфатредуцирующих бактерий (*Desulfuromusa*, *Desulfobacter*, *Desulfobalobiaceae*, *Desulfobulbus*, суммарно 12.5%), активность которых сопровождается образованием сероводорода, необходимого для развития и сохранения тиотрофных микроб-

ных матов. В микробных сообществах детритных осадков, подстилающих маты, среди архей обнаружены метаногены (суммарно 5.4%), но их численность явно недостаточна для формирования метановых сипов, наблюдаемых вблизи развития бактериальных матов.

В отличие от микробных сообществ детритных осадочных отложений и поверхностных бактериальных матов, в контрольном образце преобладали две группы некультивируемых микроорганизмов – JTB225-MBG (10.6%) и OM1 clade (9.4%).

JTB225-marine benthic group (MBG) часто обнаруживают в морских донных осадках, в том числе с малым количеством органического вещества (Mußmann et al., 2017). На данный момент не удалось выделить ни одного представителя JTB225-MBG в чистую культуру. Геном этих микроорганизмов также не был до сих пор секвенирован. Предположительно JTB225-MBG способны ассимилировать углекислоту (Dykstra et al., 2016) и окислять серу (Bowman et al., 2005). Микроорганизмы OM1 clade относятся к морским микробактериям порядка “*Ca. Actinomarinales*” (Ghai et al., 2013). Также как и JTB225-MBG, OM1 clade не имеет культивируемых представителей или собранных геномов. Они являются типичными обитателями донных морских отложений, но об их физиологии и экологической роли пока ничего не известно (Ghai et al., 2013; Bienhold et al., 2016). В образцах из поверхностных обрастаний и детрита эти две группы некультивируемых микроорганизмов были представлены значительно меньшим количеством последовательностей (суммарно менее 1%). Вероятно, эти микроорганизмы характерны именно для обедненных доступным органическим веществом местообитаний (Bienhold et al., 2016).

Обращает на себя внимание тот факт, что ни в бактериальных матах, ни в подстилающих осадках нам не удалось обнаружить значимого количества последовательностей гена 16S рНК аэробных метанотрофных бактерий и анаэробных метанотрофных архей, которые обычно развиваются в зонах метановых сипов (Roalkvam et al., 2011; Savvichev et al., 2018). Объяснением этому может быть только то, что наблюдаемые струйные газовыделения в Мраморной бухте напрямую не связаны с образованием микробных матов. Вместе с тем ограниченная пространственная локализация микробных матов позволяет предполагать, что устойчивый поток сероводорода, необходимый для массового развития *Arcobacter* с образованием нитей элементарной серы, становится следствием нескольких, возможно, взаимосвязанных причин. Мы проводили отбор и изучение бактериальных матов в конце летнего периода, когда обычно наблюдается максимальный прогрев воды, развитие и отмирание микро- и макроводорослей. Особенности микрорельефа дна и при-

донных течений, способствующих локальному накоплению детритных осадков с высокой скоростью разложения ОВ и образования достаточных количеств сероводорода при участии сульфатредуцирующих бактерий, может способствовать развитию тиотрофных матов. Второй причиной формирования локальных потоков сероводорода из осадочных отложений может быть разгрузка обогащенных сероводородом подземных вод – явление, которое ранее отмечалось на шельфе Черного моря и в других прибрежных зонах морских водоемов (Леин и соавт., 1995). Не исключено также, что “спусковым крючком” образования микробных матов может быть высачивание подземных вод с образованием характерных углублений в рельефе дна, где затем скапливается и в летний период начинает активно разлагаться накопленный детрит. Для уточнения причин возникновения характерных серных матов в прибрежных районах Черного моря мы планируем продолжить сезонные наблюдения за циклом их развития и, возможно, микробной сукцессией.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00023 и госзадания 0104-2018-0030, анализ результатов высокопроизводительного секвенирования был выполнен из средств гранта РНФ № 17-74-30025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брюханов А.Л., Власова М.А., Малахова Т.В., Перевалова А.А., Пименов Н.В. Филогенетическое разнообразие бактерий цикла серы в осадках Херсонесской бухты // Микробиология. 2018. Т. 87. № 3. С. 279–290.
- Bryukhanov A.L., Vlasova M.A., Malakhova T.V., Perevalova A.A., Pimenov N.V. Phylogenetic diversity of the sulfur cycle bacteria in the bottom sediments of the Chersonesus Bay // Microbiology (Moscow). V. 87. № 3. P. 372–381.
- Егоров В.Н., Пименов Н.В., Малахова Т.В., Канапацкий Т.А., Артемов Ю.Г., Малахова Л.В. Биогеохимические характеристики распределения метана в воде и донных осадках в местах струйных газовыделений в акватории Севастопольских бухт // Морск. экол. журнал. 2012. Т. 11. № 3. С. 41–52.
- Иванов В.Е., Ломакин И.Э., Тополюк А.С., Ефремова Л.Л., Болдырев С.Н. Особенности тектоники юго-западного Крыма // Геология и полезные ископаемые мирового океана. 2009. № 4. С. 27–39.
- Леин А.Ю., Егоров В.Н., Пименов Н.В., Гулин М.Б., Лют К., Лют У., Артемов Ю.Г., Поликарпов Г.Г., Тиль Х., Иванов М.В. Сульфидные постройки со дна Черного моря // Докл. Акад. наук. 1995. Т. 340. № 5. С. 676–680.
- Малахова Т.В., Канапацкий Т.А., Егоров В.Н., Малахова Л.В., Артёмов Ю.Г., Евтушенко Д.Б., Гулин С.Б., Пименов Н.В. Микробные процессы и генезис струйных метановых газовыделений прибрежных районов Крымского полуострова // Микробиология. 2015. Т. 84. № 6. С. 743–752.
- Malakhova T.V., Egorov V.N., Malakhova L.V., Artemov Y.G., Evtushenko D.B., Gulin S.B., Kanapatskii T.A., Pimenov N.V. Microbial processes and genesis of methane gas jets in the

- coastal areas of the Crimean Peninsula // *Microbiology (Moscow)*. 2015. V. 84. P. 838–845.
- Пименов Н.В., Русанов И.И., Поглазова М.Н., Митюшина Л.Л., Сорокин Д.Ю., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Бактериальные обрастания на коралловидных постройках в местах выхода метановых газовыделений в Черном море // *Микробиология*. 1997. Т. 66. № 3. С. 421–428.
- Pimenov N.V., Rusanov I.I., Poglazova M.N., Mityushina L.L., Sorokin D.Yu., Khmelena V.N., Trotsenko Yu.A. Bacterial mats on coral-like structures at methane seeps in the Black Sea // *Microbiology (Moscow)*. 1997. V. 66. P. 354–360.
- Пименов Н.В., Саввичев А.С., Русанов И.И., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробиологические процессы цикла углерода и серы на холодных метановых сипах северной Атлантики // *Микробиология*. 2000. Т. 69. № 6. С. 831–843.
- Pimenov N.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Ivanov M.V., Lein A.Yu. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycles at cold methane seeps of the North Atlantic // *Microbiology (Moscow)*. 2000. V. 69. P. 709–720.
- Akagawa M., Yamasato K. Synonymy of *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *homari*, and *Deleya aesta*: *Deleya aquamarina* comb. nov. as the type species of the genus *Deleya* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1989. V. 39. P. 462–466.
- Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative // *Syst. Biol.* 2006. V. 55. P. 539–552.
- Bienhold C., Zinger L., Boetius A., Ramette A. Diversity and biogeography of bathyal and abyssal seafloor bacteria // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 1. P. e0148016.
- Bowman J.P., McCammon S.A., Dann A.L. Biogeographic and quantitative analyses of abundant uncultivated gamma-proteobacterial clades from marine sediment // *Microb. Ecol.* 2005. V. 49. P. 451–460.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. P. 335–336.
- Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population // *Scand. J. Statistics*. 1984. V. 11. P. 265–270.
- Dyksma S., Bischof K., Fuchs B.M., Hoffmann K., Meier D., Meyerdierks A., Pjevac P., Probandt D., Richter M., Stepanauskas R., Mußmann M. Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in coastal sediments // *ISME J.* 2016. V. 10. P. 1939–1953.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. V. 2. № 1. P. 6.
- Fossing H., Gallardo V.A., Jørgensen B.B., Hüttel M., Nielsen L.P., Schulz H., Canfield D.E., Forster S., Glud R. N., Gundersen J. K., Küver J., Ramsing N. B., Teske A., Thamdrup B., Ulloa O. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca* // *Nature*. 2002. V. 374. P. 713–715.
- Ghai R., Mizuno C.M., Picazo A., Camacho A., Rodriguez-Valera F. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2471.
- Grünke S., Felden J., Lichtschlag A., Girmth A.-C., De Beer D., Wenzhofer F., Boetius A. Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea) // *Geobiology*. 2011. V. 9. P. 330–348.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // *Syst. Biol.* 2010. V. 59. P. 307–321.
- Ivanov M.V., Lein A.Yu. Fractionation of stable isotopes of carbon and sulfur during biological processes in the Black Sea // *Past and Present Water Column Anoxia* / Ed. Nereitin L.N. Berlin: Springer, 2006. P. 373–417.
- Jessen G.L., Lichtschlag A., Struck U., Boetius A. Distribution and composition of thiotrophic mats in the hypoxic zone of the Black Sea (150–170 m water depth, Crimea margin) // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1011–1024.
- Jørgensen B.B. Mineralization of organic matter in the sea bed – the role of sulfate reduction // *Nature*. 1982. V. 296. P. 643–645.
- Jørgensen B.B., Fossing H., Wirsén C.O., Jannasch H.W. Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline // *Deep-Sea Res.* 1991. V. 38. P. 1083S–1103S.
- Kuever J., Rainey F. A., Widdel F. *Desulfuromonas* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015. P. 1–7.
- Lein A., Pimenov N., Guillou C., Martin J.-M., Lancelot C., Rusanov I., Yusupov S., Miller Yu., Ivanov M. Seasonal dynamics of the sulphate reduction rate on the north-western Black Sea shelf // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2002. V. 54. P. 385–401.
- Lever M.A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A.B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B.B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 476.
- Lloyd K.G., Albert D.B., Biddle J.F., Chanton J.P., Pizarro O., Teske A. Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 1. P. e8738. doi 10.1371/journal.pone.0008738
- McKay L.J., MacGregor B.J., Biddle J.F., Albert D.B., Mendlovitz H.P., Hoer D.R., Lipp J.S., Lloyd K.G., Teske A.P. Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments // *Deep Sea Res.* 2012. V. 67. P. 21–31.
- Merkel A.Y., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Y., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // *Extremophiles*. 2017. V. 21. P. 307–317.
- Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane // *Science*. 2002. V. 297. P. 1013–1015.
- Mußmann M., Pjevac P., Krüger K., Dyksma S. Genomic repertoire of the *Woeseiaceae*/JTB255, cosmopolitan and abundant core members of microbial communities in marine sediments // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 1276–1281.
- Niemann H., Lösekann T., Beer D.D., Elvert M., Nadalig T., Knittel K., Amann R., Sauter E.J., Schlüter M., Klages M., Foucher J.P., Boetius A. Novel microbial communities of the

- Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink // *Nature*. 2006. V. 443. P. 854–858.
- Omeregie E.A., Mastalerz V., de Lange G., Straub K.L., Kappler A., Røy H., Stadnitskaia A., Foucher J.-P., Boetius A. Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefred Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3198–3215.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. Database issue. P. D590–D596.
- Reeburgh W.S., Bess B.W., Whalen S.C., Sandbeck K.A., Kilpatrick K.A. Black Sea methane geochemistry // *Deep-Sea Res.* 1991. V. 38. P. S1189–S1210.
- Roalkvam I., Jørgensen S.L., Chen Y., Stokke R., Dahle H., Hocking W.P., Lanz'en A., Haflidason H., Steen I.H. New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments // *FEMS Microbiol Ecol.* 2011. V. 78. P. 233–243.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Kravchishina M.D., Galkin S.A., Novigatskii A.N., Sigalevich P.A., Merkel A.Yu., Ravin N.V., Pimenov N.V., Flint M.V. Methane as an organic matter source and the trophic basis of a Laptev Sea cold seep microbial community // *Geomicrobiol. J.* 2018. V. 35. I. 5. P. 411–423.
- Schloss P.D., Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil // *PLoS Comput. Biol.* 2006. V. 2. P. e92.
- Schulz H.N., Brinkhoff T., Ferdelman T.G., Mariné M.H., Teske A., Jørgensen B.B. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments // *Science*. 1999. V. 284. P. 493–495.
- Sievert S.M., Wieringa E.B.A., Wirsén C.O., Taylor C.D. Growth and mechanism of filamentous-sulfur formation by *Candidatus Arcobacter sulfidicus* in opposing oxygen-sulfide gradients // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 271–276.
- Sorokin Yu.I. The Black Sea // *Ecosystems of the world: estuaries and enclosed seas* / Ed. Ketchum B.H. Amsterdam: Elsevier, 1983. P. 253–292.
- Taylor C.D., Wirsén C.O., Gail F. Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 2253–2255.
- Treude T., Orphan V., Knittel K., Gieseke A., House C.H., Boetius A. Consumption of methane and CO₂ by *Methanotrophic* microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 2271–2283.
- Wirsén C.O., Sievert S.M., Cavanaugh C.M., Molyneux S.J., Ahmad A., Taylor L.T., DeLong E.F., Taylor C.D. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 316–325.

Structure of Microbial Mats in the Mramornaya Bay (Crimea) Coastal Areas

N. V. Pimenov¹*, A. Yu. Merkel¹, I. Yu. Tarnovetskii², T. V. Malakhova³, O. S. Samylina¹,
T. A. Kanapatskii¹, E. N. Tikhonova¹, and M. A. Vlasova¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, Sevastopol, Russia

*e-mail: npimenov@mail.ru

Received April 2, 2018

Abstract—The structure of microbial mats from the Mramornaya Bay (Crimea) was investigated. Light microscopy in combination with transmission and scanning electron microscopy revealed the base of bacterial mats to be interwoven thin filaments (100 to 500 nm in diameter) consisting mainly of sulfur. Numerous bean-shaped single microbial cells, ~1.6 × 0.7 μm, some of which were attached to sulfur filaments, were also revealed. High-throughput sequencing of the 16S rRNA genes revealed predominance of bacteria of the genera *Arcobacter* (27%), *Alcaligenes* (17%), and *Desulfuromonas* (8.5%) as well as of uncultured members of the family *Lachnospiraceae* (4.9%). No clearly predominant microbial taxa were revealed in the detritus sample below the mats. Similar to the bacterial mat, bacteria of the genera *Arcobacter* and *Desulfuromonas* were predominant in the detritus, but their relative abundance was significantly lower (4.1 and 6%, respectively). Analysis of the 16S rRNA gene sequences specific for the genus *Arcobacter* revealed considerable phylogenetic diversity of this group in the samples from both the upper bacterial mats and the detritus sediment. Most of obtained sequences formed common clusters with the sequences of various uncultured members of the genus *Arcobacter*, while an insignificant share of them was related to the recently described sulfide-oxidizing bacterium “*Candidatus Arcobacter sulfidicus*”. Thus, members of the phylogenetically heterogeneous group of epsilonproteobacteria of the genus *Arcobacter* were the dominant component of the Mramornaya Bay microbial communities.

Keywords: microbial mats, sulfur filaments, sulfur-oxidizing microorganisms, *Arcobacter*, 16S rRNA gene high-throughput sequencing

БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ АНТАРКТИКИ – ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ

© 2018 г. Т. А. Ефименко^{а, *}, О. В. Ефременкова^а, Е. В. Демкина^б, М. А. Петрова^с,
И. Г. Сумарукова^а, Б. Ф. Васильева^а, Г. И. Эль-Регистан^б

^аНаучно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

^бФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, Россия

^сИнститут молекулярной генетики
Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: efimen@inbox.ru

Поступила в редакцию 29.03.2018 г.

Показана перспективность использования нетрадиционных источников выделения бактериальных изолятов для выявления среди них эффективных продуцентов антибиотиков, в том числе в отношении штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Из вечной мерзлоты Антарктики выделены 32 штамма бактерий и исследована их способность в условиях глубинного культивирования образовывать антимикробные вещества, эффективные в отношении 12 тестерных штаммов, в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Выявлены 13 штаммов, синтезирующих антибиотические вещества различного спектра действия, из них для дальнейшего изучения как наиболее перспективные отобраны семь штаммов. Микробиологическими методами и анализом нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК определена их видовая принадлежность: шесть штаммов спорообразующих бактерий отнесены к роду *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. safensis*, *B. subtilis*) и один идентифицирован как *Gordonia terrae*. Впервые обнаружена антимикробная активность двух штаммов *B. mojavensis* INA 01149 и INA 01151, двух штаммов *B. safensis* INA 01153 и INA 01154, а также штамма *B. licheniformis* INA 01155 в отношении антибиотикорезистентного тестерного штамма *Leuconostoc mesenteroides* VKPM В-4177 (VR). Антибиотическая активность двух штаммов *B. safensis* INA 01153 и INA 01154 в отношении тестерных бактерий, в том числе *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Staphylococcus aureus* INA 00761 с множественной лекарственной устойчивостью, описана впервые. Выделенные из образцов вечной мерзлоты Антарктики продуценты антибиотиков представляют практический интерес для медицины в связи с нарастающей во всем мире проблемой антибиотикорезистентности патогенных бактерий.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бактерии – продуценты антибиотиков, бактерии вечной мерзлоты Антарктики

DOI: 10.1134/S0026365618050087

В последние десятилетия в связи с быстрым распространением антибиотикорезистентности патогенных бактерий в медицинской практике постоянно сокращается число эффективных антибиотиков. В 2009 г. семь патогенных бактерий были обозначены как особо опасные в связи с их высокой устойчивостью к антибиотикам: *Enterococcus faecium* (VRE), *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella* spp. и *Escherichia coli* (ESBL, extended spectrum beta-lactamases), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. (Boucher et al., 2009). В феврале 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список уже из тринадцати особо опасных для здоровья человека антибиотикорезистентных бактерий с множественной лекарствен-

ной устойчивостью: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* (VR), *Staphylococcus aureus* (MR, VR, VI), *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* и *Shigella* spp. (http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1).

Причинами множественной лекарственной устойчивости считают, с одной стороны, зачастую неоправданное применение антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности, создающее селективное давление на микроорганизмы и приведшее к возникновению устойчивых форм болезнетворных микроор-

ганизмов (Ventola, 2015). С другой стороны, исследования последних лет обнаружили высокий уровень антибиотикорезистентных микробных изолятов, а также детерминант антибиотикорезистентности и генетических элементов их горизонтального переноса у микроорганизмов из антропогенно чистых экосистем, в частности из вечной мерзлоты (тыс.—млн лет) Арктики и Антарктики (Петрова и соавт., 2008; Petrova et al., 2009). Последнее позволило заключить, что система адаптивной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам сформировалась задолго до антропогенного давления, которое является лишь селективным фактором.

В 2006 г. в научную практику было введено понятие “глобальной резистомы” как совокупности всех генов резистентности к антибиотикам в геномах всех микроорганизмов — патогенных и непатогенных, живущих в природных условиях в самых разнообразных биотопах (D’Costa et al., 2006; Виноградова и соавт., 2013). Само существование резистомы предполагает наличие множества продуцентов антибиотиков, основная функция которых в биотопах — информационный сигналинг, в связи с чем для антибиотиков предложен новый термин “информобиотики” (Кожевин и соавт., 2014).

Стало очевидным, что решение фундаментальной задачи медицины — повышение эффективности антибиотикотерапии в борьбе с инфекционными заболеваниями, должно разрабатываться в двух направлениях: выяснения фундаментальных причин не только распространения, но и возникновения антибиотикорезистентности (Levin, 2017; Levin-Reisman et al., 2017) и скрининга новых антибиотиков. Следует констатировать, что проблема быстрого распространения антибиотикорезистентности среди патогенных микроорганизмов усугубляется отсутствием достаточного числа эффективных препаратов антибиотиков и носит глобальный характер. По данным ВОЗ с 2000 по 2015 год в мире было внедрено в медицинскую практику 30 новых антибиотиков. Из них новыми природными антибиотиками являются только два, тогда как 12 представляют продукты трансформации природных антибиотиков и 16 соединений синтезированы искусственно (Butler, 2013; Butler, 2017). Таким образом, проблема распространения устойчивости к противомикробным препаратам по оценке ВОЗ является главным вызовом, с которым столкнулось современное здравоохранение, и требует поиска новых антибиотиков, эффективных в отношении бактерий, обладающих антибиотикорезистентностью.

Целью настоящей работы было провести поиск продуцентов антибиотиков среди бактерий, изолированных из нетрадиционного природного источника — многолетнемерзлых отложений Ан-

тарктики, в том числе обладающих активностью в отношении тестерных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (множественная лекарственная устойчивость), *Staphylococcus aureus* INA 00761 (устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, MRSA), *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (устойчивость к антибиотикам группы ванкомицина, VR).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были древние микробные сообщества, выделенные из природных образцов многолетнемерзлых пород Антарктики. Породы представляют собой отложения морской террасы о. Кинг-Джордж (ст. Беллингаузен), сильно промытые флювиогляциальными водами. Температура на станции колеблется от -8.2 до 0.5°C , что в среднем составляет -2.95°C . В соответствии с данными статистических характеристик эмпирических распределений атмосферного давления по месяцам средний показатель давления за год имеет величину 991.24 Па. Перепады давления незначительные: от 987.80 до 995.10 Па. Скорость ветра на станции изменяется в пределах 5.30–7.80 м/с, в среднем составляя 6.85 м/с. Возраст исследуемых отложений составляет 7.5 тыс. лет, а льдистость колеблется от 10 до 36%. Образцы были получены из скважины В1-09 глубиной 9 м. Содержание органического углерода — около 0.1%.

Микроорганизмы. Из мерзлых отложений Антарктики выделено 32 штамма бактерий для выявления продуцентов антибиотиков.

В качестве тест-культур для определения антимикробной активности использовали следующие микроорганизмы: грамположительные бактерии — *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (устойчивость к ванкомицину >400 мкг/мл, VR), *Staphylococcus aureus* INA 00761 (устойчивость к оксацилину 32 мкг/мл, MRSA), *S. aureus* FDA 209P (устойчивость к оксацилину 0.125 мкг/мл, MSSA), грамотрицательные бактерии — *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (множественная лекарственная устойчивость, MDR), *Comamonas terrigena* VKPM B-7571 и грибы — *Aspergillus niger* INA 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259.

Условия культивирования. Бактерии — продуценты антибиотиков, полученные в чистых культурах, выращивали в среде № 2 Гаузе следующего состава (%): глюкоза — 1, пептон — 0.5, триптон — 0.3, NaCl — 0.5; pH 7.2–7.4. Глубинное культивирование осуществляли при 28°C в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 150 мл среды, на качалке (220 об/мин). Посевной материал

вносили в колбы бактериологической петлей. Для поверхностного культивирования микроорганизмов использовали модифицированную агаровую (2%) среду № 2 Гаузе. Грибные тест-культуры, а также *C. terrigena* и *L. mesenteroides* выращивали на сусло-агаре при температуре 28°C, бактериальные тест-штаммы – при 37°C.

Микробиологическое разнообразие бактерий определяли с помощью светового микроскопа Olympus BX41TF (Япония). При окрашивании по Граму в качестве положительного и отрицательного контролей использовали штаммы *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922 соответственно.

Определение антимикробной активности. Антимикробную активность в культуральной жидкости исследуемых бактерий определяли методом диффузии в агар на 2, 4 и 7 сут инкубирования, для чего культуральную жидкость закапывали в лунки диаметром 9 мм в чашки с агаровой средой. Об уровне антимикробной активности судили по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг лунок.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК бактериальных штаммов-продуцентов антибиотиков. Геномную ДНК из бактериальных клеток выделяли, используя набор реактивов “BioSilica” (номер в каталоге GBD100), согласно рекомендациям производителя. Для амплификации гена 16S рНК использовали универсальные консервативные праймеры прокаринот 27F и 1492R (James, 2010). ПЦР проводили в режимах: (1) 94°C – 5 мин, (2) 30 циклов с чередованием температурных интервалов: 94°C – 1 мин, 51°C – 1 мин, 72°C – 2 мин, (3) 72°C – 7 мин. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле при напряженности электрического поля 7.6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР осуществляли методом спиртового переосаждения ДНК в мягких условиях (0.125M ацетат аммония в 70% этиловом спирте). Секвенирование очищенных фрагментов ДНК проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (“Applied Biosystems”, США). Для анализа последовательностей использовали базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и Ribosomal Database Project (<http://www.cme.msu.edu>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали образцы вечной мерзлоты Антарктики. Многолетнемерзлые отложения характеризуются постоянными отрицательными температурами и отсутствием миграции свободной воды, что позволяет сохранять биологический материал с момента заморозания. Были исследованы керны скважин, пробуренных в свободных ото льда оазисах Антарктиды. Скважины

расположены на острове Кинг Джордж, станция Беллинсгаузен.

Скважина В1-09 (глубина 9 м), из которой был взят образец, вскрывает отложения морской террасы, сильно промытые флювиогляциальными водами. Средняя температура отложений породы составляет –1°C. Отложения представлены (сверху вниз): до 5 см – крупным галечником, до 7.5 м – мерзлым песком, до 9 м – суглинком. Значения рН варьируют от 7.23 до 9.82. Возраст пород – 7.5 тыс. лет.

Прямые высевы на плотные питательные среды (TSB, TSB/2, R2A, R2A/2) не выявили колониеобразующих клеток. Были предприняты действия по подготовке образца и реактивации клеток перед их высевом. Для этого навеску образца прединкубировали в физрастворе (1 : 10) с 0.5% пиродифосфата при 28°C в течение 10 сут. Полученной суспензией инокулировали жидкую среду TSB (10% инокулята), инкубировали на орбитальной качалке (130 об/мин) в течение 3 сут. При высеве на агаризованную среду TSE/2 количество колониеобразующих клеток составило 5×10^3 КОЕ/мл.

На втором этапе проводили процедуры дополнительной реактивации клеток с использованием комплексного раствора следующих веществ: ИУК – 10^{-4} М, С7-АОБ – 4×10^{-4} М, пируват натрия – 0.1%, эпинифрин – 5×10^{-5} М. Инкубирование суспензии клеток в указанном растворе (1 : 100) в течение 3 сут позволило увеличить количество КОЕ при высеве на плотную среду R2A/2 еще на два порядка по сравнению с высевом без реактивации.

Способность продуцировать антибиотики исследовали у 32 изолятов, полученных в чистых культурах стандартными методами последовательных пересевов. Было установлено, что из 32 штаммов 13 проявляют антибиотическую активность (табл. 1). В качестве продуцентов антибиотиков наибольший интерес представляли семь штаммов, которые были лиофилизированы и депонированы в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ “НИИНА”. Четыре из них: INA 01149, INA 01150, INA 01151 и INA 01153, были активны в отношении тест-штамма *L. mesenteroides* VKPM В-4177 (VR), один (INA 01165) подавлял рост тест-штамма *S. aureus* INA 00761, и еще два штамма, INA 01154 и INA 01155, проявляли активность в отношении как *L. mesenteroides* VKPM В-4177 (VR), так и *S. aureus* INA 00761 (MRSA). Окрашивание по Граму показало, что все они относятся к грамположительным бактериям, шесть из них образуют эндоспоры. Последующая видоизмененная идентификация на основании анализа последовательностей гена 16S рНК показала, что споробразующие бактерии относятся к представителям рода *Bacillus* (табл. 2). Штамм INA 01165

через 1 сут роста формирует колонии оранжевого цвета, на 2 сут интенсивность окраски увеличивается незначительно и сохраняется при дальнейшем инкубировании, пигмент не диффундирует в среду, клетки размером 1–1.5 мкм, кокковидные или в виде коротких палочек, цепочки клеток не образуются. Согласно анализу ДНК штамм INA 01165 был отнесен к виду *Gordonia terrae* (табл. 2).

Все идентифицированные штаммы – продуценты антибиотиков лиофилизированы и депонированы в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ “НИИНА”. Последовательности гена 16S рНК депонированы в базу данных GenBank под номерами MF186223–MF186225, MF186227–MF186229 и MF278747.

Большинство выделенных штаммов, обладающих антибиотической активностью, относятся к спорообразующим бактериям. Представители рода *Bacillus* являются наиболее известными продуцентами антибиотиков среди эубактерий, их вторичные метаболиты обладают широким спектром антибиотической активности и большим разнообразием структур, благодаря чему они представляют интерес для медицинского применения. Штаммы *Bacillus* spp. способны образовывать рибосомально синтезированные антимикробные пептиды (АМП), множество нерибосомально синтезированных АМП, поликетидные антибиотики, противогрибковые липопептидные антибиотики (итурин, фенгицин) и ризоктицины (Bérdu, 2005; Fickers, 2012; Sumi et al., 2015). Несмотря на существование большого количества штаммов рода *Bacillus*, обладающих антибиотической активностью, на сегодняшний день, тем не менее, антибиотические вещества описаны для малой доли штаммов (Fickers, 2012). Поэтому дальнейшие поиски продуцируемых бациллами природных соединений, преодолевающих лекарственную устойчивость патогенных штаммов, являются актуальными и перспективными.

В 2014 г. описан штамм *B. mojavensis* CWBI-B1568, выделенный из аридной почвы, обладающий противогрибковой активностью в отношении человеческого патогена *Candida albicans*. Ингибирование роста гриба авторы связывают с образованием *B. mojavensis* липопептидов итурина, сурфактина и фенгицина (Youcef-Ali et al., 2014). Позже, в 2016 г, был описан эндофитный штамм *B. mojavensis* BmB 4, выделенный из стебля *Vacopa monnieri* и проявляющий антибактериальную активность в отношении *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica* Typhi. Обнаружена способность данного штамма образовывать сурфактин и фенгицин (Jasim et al., 2016). В настоящем исследовании впервые описана антимикробная активность двух выделенных из мерзлых антарктических отложений штаммов *B. mojavensis* INA 01149 (4785) и INA 01151 (4797) в

отношении антибиотикорезистентного штамма *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR) (табл. 1).

Вид *B. safensis* имеет широкий диапазон мест обитания, многие из которых являются трудными для выживания других микроорганизмов. Первоначально этот вид был идентифицирован как загрязнитель космического аппарата (SAF) в США, в результате чего получил свое видовое название *safensis*. Штаммы *B. safensis* способны продуцировать промышленно важные ферменты, каротиноиды, биосурфактанты, соединения, используемые для стимуляции роста растений и в качестве агентов биоконтроля против фитопатогенных грибов (Sun et al., 2013; Domingos et al., 2015; Lateef et al., 2015). Выделенные нами штаммы INA 01153 (4811) и INA 01154 (4812) обладают различной антибиотической активностью (табл. 1). Штамм INA 01153 активен в отношении грамположительных бактерий, в том числе действует на ванкомицин-резистентный штамм *L. mesenteroides* VKPM B-4177, а штамм INA 01154, вероятно, синтезирует несколько веществ. На 2 сут инкубирования в культуральной жидкости отмечен пик активности в отношении антибиотикоустойчивых грамположительных бактерий *S. aureus* INA 00761 (MRSA) и *L. mesenteroides* VKPM B-4177 (VR), к 7 сут роста активность в отношении этих тестерных бактерий снижалась, но достигала в КЖ наивысшего уровня в отношении грамтрицательной тест-бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. По нашим данным антибиотической активности у известных штаммов вида *B. safensis* в отношении тест-штаммов микроорганизмов, обладающих лекарственной устойчивостью, ранее описано не было.

Известен ряд соединений, образуемых штаммами *B. licheniformis* – бацилизин, лихенезины, лихеницидин, сурфактины, описана их антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий, включая резистентные штаммы *S. aureus*, и грибов (Yakimov et al., 1998; He et al., 2006; Alvarez-Ordóñez et al., 2014; Favaro et al., 2016; Штерншис и соавт., 2016). Большой интерес представляют работы, описывающие ингибирующее воздействие на образование микробных биопленок: соединения, выделенные из *B. licheniformis*, подавляли рост таких микроорганизмов как *S. aureus*, *B. pumilus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (Rivardo et al., 2009; Dusane et al., 2013). Выделенный в настоящей работе штамм *B. licheniformis* INA 01155 (4813) обладает противомикробным действием в отношении всех примененных грамположительных тест-бактерий, грамтрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922 и *Comamonas terrigena* VKPM B-7571, но не обладает противогрибковой активностью. Необходимо отметить, что активность *B. licheniformis* в отношении тестерного штамма *L. mesenteroides* в настоящей статье описана впервые.

Таблица 1. Антимикробная активность культуральных жидкостей (КЖ) изолятов бактерий – продуцентов антибиотических веществ

№ штамма в Коллекции "НИНА"	Пик активности в КЖ (сут роста)	Зоны задержки роста тест-штаммов в мм											
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. mycoides</i> 537	<i>B. pumilus</i> NCTC 8241	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	<i>Aspergillus niger</i> INA 00760
INA 01149	2	0	19.7 ± 0.6	0	0	0	19.0 ± 2.6	13.3 ± 2.5	11.6 ± 2.1	0	15.6 ± 0.6	0	0
INA 01150	2	0	24.7 ± 2.1	0	0	22.0 ± 1.0	18.0 ± 2.6	20.7 ± 0.6	0	11.7 ± 1.2	0	0	0
4788	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.7 ± 0.6	0
4790	7	12.3 ± 1.5	0	12.0 ± 0.0	12.0 ± 1.7	14.3 ± 0.6	0	0	0	16.3 ± 1.5	0	0	0
4794	2	0	0	0	0	0	0	12.7 ± 0.6	0	0	0	0	0
4795	2	0	15.7 ± 1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INA 01151	7	0	0	0	0	19.3 ± 1.5	13.7 ± 3.5	18.7 ± 1.5	0	0	14.3 ± 2.1	15.3 ± 0.6	0
4804	2	0	0	15.0 ± 1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4805	2	0	0	12.3 ± 2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	15.3 ± 0.6	0	0	0	10.7 ± 0.6	0	0	0
INA 01153	2	0	0	0	0	0	17.7 ± 2.5	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	19.7 ± 1.5	0	0	0	0	0	0	0
INA 01154	2	17.3 ± 1.2	0	0	0	0	16.6 ± 1.5	0	0	0	0	0	0
	7	11.3 ± 0.6	19.3 ± 2.1	11.3 ± 1.2	0	0	0	0	12.3 ± 1.2	0	16.0 ± 1.0	0	0
INA 01155	2	15.6 ± 1.2	13.7 ± 1.5	14.3 ± 2.5	14.0 ± 1.0	17.0 ± 2.6	21.0 ± 2.6	14.3 ± 0.6	0	16.7 ± 0.6	0	0	0
INA 01165	2	11.3 ± 1.2	11.7 ± 0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	17.7 ± 2.5	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 2. Видовая идентификация бактерий, обладающих выраженными антимикробными свойствами, на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК

Штамм	Длина прочтения ДНК, н.о.	Идентичность, %	ID GenBank*
<i>Bacillus mojavensis</i> INA 01149	1373	99.2	MF186223
<i>B. subtilis</i> INA 01150	1366	100	MF186224
<i>B. mojavensis</i> INA 01151	1377	99.2	MF186225
<i>B. safensis</i> INA 01153	1384	100	MF186227
<i>B. safensis</i> INA 01154	1350	100	MF186228
<i>B. licheniformis</i> INA 01155	1359	98.1	MF186229
<i>Gordonia terrae</i> INA 01165	1370	99.5	MF278747

* Номера последовательностей ДНК, депонированных в базу данных GenBank.

Из образца вечномерзлых отложений Антарктики нами выделен штамм *Gordonia terrae* INA 01165 (4810), проявляющий антимикробную активность в отношении золотистого стафилококка – как полирезистентного штамма *S. aureus* INA 00761 (MRSA), так и метициллинчувствительного штамма *S. aureus* FDA 209P. Род *Gordonia* филогенетически относится к подпорядку *Corynebacterineae* порядка *Actinomycetales*. Представителей *Gordonia* spp. часто трудно идентифицировать как на уровне рода, так и на уровне вида с помощью микробиологических и биохимических методов анализа. Благодаря применению молекулярных и филогенетических методов, классификация рода резко изменилась, несколько видов были переклассифицированы, и описано много новых видов (Stackebrandt, 1997; Blaschke, 2007; Lai, 2010). Местом выделения представителей *Gordonia* spp., описанных в литературе, являются природные источники, такие как почва и ризосфера растений, промышленные – нефтедобывающие скважины или зараженные углеводородами почвы, и искусственные – биореакторы для очистки сточных вод или биофильтры. Описаны виды *Gordonia* spp., входящие в симбиотические ассоциации с водными (морскими и пресноводными) и наземными беспозвоночными (Graça, 2013; Sowani, 2017). Также некоторые виды *Gordonia* spp. выделены из клинических образцов и являются оппортунистическими патогенами, способными вызывать инфекционные заболевания у людей с пониженным иммунитетом (Blaschke, 2007; Lai, 2010; Sowani, 2017). Описаны случаи нозокомиальных инфекций человека, вызванных *Gordonia* spp., связанных с хирургическим вмешательством, а также легочных заболеваний и инфекций центральной нервной системы у людей с ослабленным иммунитетом (Drancourt, 1997; Arenskötter, 2004; Lai, 2010). Род *Gordonia* вызывает большой интерес у исследователей в связи со способностью большинства видов разрушать ксенобиотики, лик-

видировать загрязнения окружающей среды, а также образовывать биологически активные соединения. Штаммы *Gordonia* spp. способны синтезировать биосурфактанты, каротиноиды, имидазолы, гортонан (кислотный полисахарид, способствующий агрегации клеток) (Arenskötter, 2004; Sowani, 2017). Имидазолы широко используются в качестве лекарственных средств, в том числе в составе антигистаминных препаратов, некоторые соединения проявляют противогрибковые свойства или действуют как противосудорожные препараты (Mikolasch, 2003; Arenskötter, 2004). Разнообразие химических соединений, синтезированных представителями рода *Gordonia*, делает эти бактерии потенциально полезными для экологической, промышленной и медицинской биотехнологии. В 2013 г. группой ученых из Португалии из морской губки *Erylus discophorus* были выделены несколько штаммов рода *Gordonia*, среди которых штамм *G. terrae* и два штамма *Gordonia* sp. проявляли антимикробную активность в отношении *B. subtilis* и *S. aureus* (MRSA) (Graça, 2013). В 2010 г. группой американских ученых у морских представителей рода *Gordonia* выявлены гены поликетидсинтаз и синтетаз нерибосомных пептидов (Gontang, 2010). Выделенный нами штамм *G. terrae* также проявляет активность в отношении полирезистентного золотистого стафилококка (табл. 1).

Как было отмечено выше, ранее описанные гены антибиотикорезистентности прокариот вечномерзлых почв Арктики и Антарктики косвенно указывают на наличие продуцентов антибиотиков в микробных сообществах этих регионов. Результаты настоящей работы подтвердили, что в микробных сообществах вечной мерзлоты Антарктики присутствуют бактерии, обладающие антимикробной активностью в отношении микроорганизмов разных таксономических групп. Полученные результаты позволяют заключить, что в сообществах вечной мерзлоты содержатся продуценты антибиотиков, представляющих интерес для медицины, поскольку некоторые из получен-

ных нами штаммов активны в отношении антибиотикорезистентных тестерных организмов, в том числе устойчивых к бета-лактамам и гликопептидным антибиотикам, что делает целесообразным их дальнейшее химическое исследование.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ по научному проекту № 17-00-00393\17 от 16.11.2017.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, ее объем, разнообразие и развитие // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. С. 5–6.
- Кожевин П.А., Виноградова К.А., Булгакова В.Г. Природные функции антибиотиков как “информобиотиков” // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. № 3. С. 3–9.
- Петрова М.А., Горленко Ж.М., Соина В.С., Миндлин С.З. Изучение ассоциации генов *strA–strB* с плазмидами и транспозонами у современных и древних штаммов бактерий // Генетика. 2008. Т. 44. № 9. С. 1281–1286.
- Petrova M.A., Gorlenko Z.M., Mindlin S.Z., Soina V.S. Association of the *strA–strB* genes with plasmids and transposons in the present-day bacteria and in bacterial strains from permafrost // Russ. J. Genetics. 2008. Т. 44. С. 1116–1120.
- Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П., Шнатова Т.В. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН, 2016. 284 с.
- Alvarez-Ordóñez A., Begley M., Clifford T., Deasy T., Conside K., O'Connor P., Ross R.P., Hill C. Investigation of the antimicrobial activity of *Bacillus licheniformis* strains isolated from retail powdered infant milk formulae // Probiotics Antimicrob Proteins. 2014. V. 6. P. 32–40.
- Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 3195–3204.
- Bérdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. 2005. V. 58. P. 1–26.
- Blaschke A.J., Bender J., Byington C.L., Korgenski K., Daly J., Petti C.A., Pavia A.T., Ampofo K. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing // Clin. Infect. Dis. 2007. V. 45. P. 483–486.
- Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 48. P. 1–12.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // J. Antibiot. 2013. V. 66. P. 571–591.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // J. Antibiot. 2017. V. 70. P. 3–24.
- D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W.L., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debryne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. Antibiotic resistance is ancient // Nature. 2011. V. 477. P. 457–461.
- Domingos D.F., de Faria A.F., de Souza Galaverna R., Eberlin M.N., Greenfield P., Zucchi T.D., Tran-Dinh N., Midgley D., de Oliveira V.M. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 3155–3167.
- Drancourt M., Pelletier J., Cherif A.A., Rault D. *Gordonia terrae* central nervous system infection in immunocompetent patient // J. Clin. Microbiol. 1997. V. 35. P. 379–382.
- Dusane D.H., Damare S.R., Nancharaiyah Y.V., Ramaiah N., Venugopalan V.P., Kumar A.R., Zinjarde S.S. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis* // PLoS One. 2013. V. 8. e64501.
- Favaro G., Bogialli S., Di Gangi I.M., Nigris S., Baldan E., Squartini A., Pastore P., Baldan B. Characterization of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* using liquid chromatography with accurate tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2016. V. 30. P. 2237–2252.
- Fickers P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? // Am. J. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 8. P. 40–46.
- Gontang E.A., Gaudêncio S.P., Fenical W., Jensen P.R. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria // App. Env. Microbiol. 2010. V. 76. P. 2487–2499.
- Graça A.P., Bondoso J., Gaspar H., Xavier J.R., Monteiro M.C., de la Cruz M., Oves-Costales D., Vicente F., Lage O.M. Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial communities from the marine sponge *Erylus discophorus* (Astrophorida, Geodiidae) // PLoS One. 2013. V. 8. e78992.
- He L., Chen W., Liu Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12 // Microbiol. Res. 2006. V. 161. P. 321–326.
- James G. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene // PCR for Clinical Microbiology / Eds. Schuller M., Sloots T., James G., Halliday C., Carter I. Dordrecht: Springer, 2010. P. 209–214.
- Jasim B., Sreelakshmi S., Mathew J., Radhakrishnan E.K. Identification of endophytic *Bacillus mojavensis* with highly specialized broad spectrum antibacterial activity // 3 Biotech. 2016. V. 6. № 2. P. 187.
- Lai C.C., Wang C.Y., Liu C.Y., Tan C.K., Lin S.H., Liao C.H., Chou C.H., Huang Y.T., Lin H.I., Hsueh P.R. Infections caused by *Gordonia* species at a medical centre in Taiwan, 1997 to 2008 // Clin. Microbiol. Infect. 2010. V. 16. P. 1448–1453.
- Lewis K., Shan Y. Why tolerance invites resistance // Science. 2017. V. 355. P. 796.
- Levin B.R., Baquero F., Ankomah P., McCall. I.C. Phagocytes, antibiotics and self-limiting bacterial infections // Trends Microbiol. 2017. V. 25. P. 878–892.
- Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shoshani N., Balaban N.Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance // Science. 2017. V. 355. P. 826–834.
- Mikolasch A., Hammer E., Schauer F. Synthesis of imidazol-2-yl amino acids by using cells from alkane-oxidizing bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 1670–1679.
- Petrova M., Gorlenko Z., Mindlin S. Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 296. P. 190–197.
- Rivardo F., Turner R.J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M.G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by

- Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 83. P. 541–553.
- Sowani H., Kulkarni M., Zinjarde S. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species // Crit. Rev. Microbiol. 2017. V. 25. P. 1–21.
- Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 479–491.
- Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Hahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics // Can. J. Microbiol. 2015. V. 61. P. 93–103.
- Sun H., He Y., Xiao Q., Ye R., Tian Y. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum* // Afr. J. Microbiol. Res. 2013. V. 7. P. 1496–1504.
- Ventola C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats // P. T. 2015. V. 40. P. 277–283.
- Yakimov M.M., Kröger A., Slepak T.N., Giuliano L., Timmis K.N., Golyshin P.N. A putative lichenysin A synthetase operon in *Bacillus licheniformis*: initial characterization // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1399. № 2–3. P. 141–153.
- Youcef-Ali M., Kacem Chaouche N., Dehimat L., Bataiche I., Kara Ali M., Cawoy H., Thonart P. Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis* // African J. Microbiol. Res. 2014. V. 8. P. 476–484.

Bacteria Isolated from Antarctic Permafrost are Efficient Antibiotic Producers

T. A. Efimenko^{1, *}, O. V. Efremenkova¹, E. V. Demkina², M. A. Petrova³, I. G. Sumarukova¹,
B. F. Vasilyeva¹, and G. I. El'-Registan²

¹*Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia*

²*Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

³*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: efimen@inbox.ru

Received March 29, 2018

Abstract—Nontraditional sources were shown to be promising for obtaining bacterial isolates characterized by efficient production of antibiotics, including those affecting the strains with multidrug resistance. From Antarctic permafrost, 32 bacterial strains were isolated, and their ability to synthesize antimicrobial compounds efficient against 12 test strains, including the ones with multidrug resistance, was studied in sub-merged cultures. Out of 13 strains producing antibiotic compounds with different spectra of action, seven were chosen for further study. Their species identification was carried out by microbiological techniques and by analysis of their 16S rRNA gene sequences. Six strains of spore-forming bacteria were identified as *Bacillus* species (*B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. safensis*, and *B. subtilis*), while one strain was identified as *Gordonia terrae*. Antimicrobial activity of two *B. mojavensis* strains (INA 01149 and INA 01151), two *B. safensis* strains (INA 01153 and INA 01154), and *B. licheniformis* strain INA 01155 against the antibiotic-resistant tester strain *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (VR) was revealed. Antibiotic activity of two *B. safensis* strains (INA 01153 and INA 01154) against tester bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* INA 00761 with multidrug resistance has not been reported previously. Antibiotic producers isolated from Antarctic permafrost samples are of interest to medicine due to the global issue of increasing antibiotic resistance of pathogenic bacteria.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotic-producing bacteria, bacteria of Antarctic permafrost

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДООКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАЗНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН

© 2018 г. М. И. Чернявская^а*, А. А. Букляревич^а, Я. А. Делеган^б,
А. Э. Охремчук^а, А. Е. Филонов^б, М. А. Титок^с

^аНИЛ биотехнологии кафедры микробиологии, биологический факультет,
Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

^бЛаборатория биологии плазмид, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Россия

^сКафедра микробиологии, биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, Республика Беларусь

*e-mail: charynmi@bsu.by

Поступила в редакцию 28.12.2017 г.

Исследованы углеводородоокисляющие бактерии, выделенные из образцов почвы и грунта разных климатических зон (Беларусь, Ливия, Ирак, Антарктида). Методами физиолого-биохимического и молекулярно-генетического анализа идентифицировано 18 штаммов, большинство из которых отнесены к группе немитциальных актиномицетов. Для идентификации бактерий рода *Rhodococcus* информативными генетическими маркерами оказались гены *alkB* (для *R. pyridinivorans*), *rpoC* и *groES* (для *R. erythropolis*), *groEL* (для *R. opacus*), а также случайные фрагменты хромосомы (для *R. opacus* и *R. pyridinivorans*). Изолированные из песчаной почвы Ливии и антарктического грунта бактерии, идентифицированные как *Dietzia* sp. 10–15, *Deinococcus* sp. A2–6, *Alkanindiges* sp. A36–1 и *Alkanindiges* sp. A36–3, имеют низкое сходство генов 16S рРНК с генами ближайших видов и отличаются рядом физиолого-биохимических свойств, что свидетельствует об их принадлежности к новым видам. На основании сравнительного физиолого-биохимического и фингерпринт-анализа ряда штаммов, принадлежащих к одному и тому же виду, установлен внутривидовой полиморфизм. Среди исследованных бактерий выявлены штаммы, способные расти как при высоких, так и низких температурах, устойчивые к УФ-облучению, повышенной концентрации NaCl, кислым и щелочным условиям. Для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar впервые показана способность деградировать нефть при повышенной температуре 45°C, а для бактерий *R. erythropolis* A2-h2 – при температуре 4°C.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, углеводороды, молекулярно-генетический и физиолого-биохимический анализ

DOI: 10.1134/S0026365618050063

Одним из быстро развивающихся направлений экологической биотехнологии, ставящей перед собой задачу безопасной очистки естественной среды обитания от загрязнений природного и антропогенного происхождения, является использование микроорганизмов-деструкторов, способных эффективно разлагать опасные поллютанты, не нанося вред сложившимся биоценозам. В этом плане большой интерес представляют углеводородоокисляющие бактерии, хорошо адаптирующиеся к стрессовым условиям среды: высоким и низким температурам и влажности, радиации, способные развиваться в почвенном покрове с отсутствием плодородного слоя, в условиях повышенной концентрации солей, кислых и щелочных средах. Эффективные штаммы-деструкторы, характеризующиеся такими свойствами, могут использоваться для биоремедиации территорий, загрязненных

нефтью, в условиях, далеких от физиологической нормы.

Успешное практическое использование углеводородоокисляющих бактерий, выделенных из природной среды обитания, предполагает изучение их таксономического положения и физиологических свойств. Традиционно для идентификации бактерий в качестве ключевого генетического маркера используют гены 16S рРНК (Amann et al., 1994; Bell et al., 1999; Clarridge, 2004). Для уточнения видовой принадлежности микроорганизмов применяется нумерическая таксономия, хемотаксономия, ДНК–ДНК-гибридизация, мультилокусное и полногеномное секвенирование (Das et al., 2014). В качестве генетических детерминант (в частности, *gyrA*, *gyrB*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*, *recA*, *recN*, *dnaB*, *dnaG*, *groEL*), определяющих жизненно важные функции бактериальной клетки, а

Таблица 1. Источники выделения бактерий – деструкторов нефти

Штамм	Источник выделения	Время выделения, год*	Коллекционный номер**
AL18	Почва, автобусная остановка в г. Витебске, Беларусь	2008	БИМ В-847 Г
GP1	Почва, берег озера Мястро, г. Мядель, Беларусь	2009	БИМ В-846 Г
A2-h2, A2-6	Грунт аллювиальный, низовья временного водотока, впадающего в оз. Нижнее, Восточная Антарктида (содержание нефтепродуктов 7413.8 мг/кг)	2013	БИМ В-875 Г, БИМ В-874 Г
A29-k1	Грунт сухой, выходы коренных пород возле дизельной электростанции (ДЭС) (20 кВ), район Гора Вечерняя, оазис Холмы Тала, Восточная Антарктида (содержание нефтепродуктов 10.2 мг/кг)	2013	БИМ В-986 Г
A31-2d	Грунт сухой, выходы коренных пород возле ДЭС (60 кВ), район Гора Вечерняя, оазис Холмы Тала, Восточная Антарктида	2013	A31-2d
A36-1, A36-3	Грунт сухой, ст. Прогресс, оз. Стэппед, Восточная Антарктида	2014	БИМ В-989 Г, БИМ В-990 Г
FD9	Почва, автозаправка, Аль-Азидия, Ирак	2011	БИМ В-838 Г
5Ap, 5Ab, L5A-16	Песчаная почва, бензоколонка № 1, Эль-Азидия, Ливия	2012	БИМ В-939 Г, БИМ В-878 Г, БИМ В-877 Г
6-3	Песчаная почва, бензоколонка, Абусэте, Ливия	2012	БИМ В-940 Г
7A-3A-2	Деревянная стружка, Альсадия, Ливия	2012	7A-3A-2
8A-3A	Песчаная почва, бензоколонка № 640, Альтадамен, Ливия	2012	БИМ В-835 Г
10-15	Песчаная почва, бензоколонка № 1, Готэль-Шааль, Ливия	2012	БИМ В-876 Г
15-4A, 15-3A	Песчаная почва, бензоколонка № 615, Эз-Завия, Ливия	2012	15-4A, БИМ В-942 Г

* Штаммы изолированы М.И. Чернявской, С.Л. Василенко, А.Н. Хило, пробы почвы и грунта предоставлены В.Е. Мямным, Ю.Г. Гигиняком (Антарктида), Ф.Д.Х. Ал-Шаммари (Ирак), А.А. Эльгамуди (Ливия).

** Штаммы депонированы в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси (БИМ) и коллекцию кафедры микробиологии БГУ.

также специфические гены (Glazunova et al., 2009; Ventura et al., 2006). Так, для обнаружения в природной среде обитания и идентификации бактерий рода *Rhodococcus* показана информативность генов *alkB* и *catA*, кодирующих алкан-1-монооксигеназу и катехол-1,2-диоксигеназу соответственно (Tancsics et al., 2008; 2014; 2015).

Целью настоящего исследования было выделение из образцов почвы и грунта разных климатических зон штаммов-деструкторов нефтей, способных использовать углеводороды в стрессовых условиях среды, и определение их таксономической принадлежности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали 18 штаммов – деструкторов углеводородов, которые были выделены из образцов почвы и грунта, отобранных на территории Беларуси, Ливии,

Ирака и Антарктиды (табл. 1), а также коллекционный штамм *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) и плазмиды pUC19, pJET1.2 и pTZ57R/T, “Thermo Scientific” (ЕС).

Среды и условия культивирования. Бактерии выращивали на полноценной среде LB или минимальной среде M9 (Миллер, 1976). Спектр используемых субстратов – углеводов определяли по способности бактерий расти на агаризованной минеральной среде, дополненной органическим субстратом в условиях инкубирования при 28°C в течение 14 сут. В качестве источников углерода и энергии использовали: нефть (4 об. %); дизельное топливо; керосин; гексадекан; гексан; нонан; 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан; этилбензол; бензол; толуол; *o*-, *n*- и *m*-ксилолы; нафталин; пириндин (в парах); фенол (1 г/л); фенантрен; антрацен; бифенил; пирен; флюорен; нафтиламин (200 мг/л). Глюкозу, сахарозу, лактозу, ксилозу, мальтозу, целлобиозу, рибозу, арабинозу, сорбит,

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер	Последовательность	Размер ампликона (п.н.)	Ссылка
16S рРНК	8f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1484	Weisburg et al, 1991
	1492r	TACGGHTACCTTGTTACGACTT		
<i>rpoC</i>	groF	AGTGCTACTGCGGCAAGTACAAG	1236	Данная работа
	groR	ACTTGATGTTCTGCGCGTGG		
<i>alkB</i>	alk-H1F	CIGIACACGAIITIGGICACAAGAAGG	406–950	Chénier et al., 2003
	alk-H3R	IGCITGITGATCIITGTGICGCTGIAG		
<i>groELS</i>	groF	AGGAAGCCCTTGTCGAACTG	991–1078	Данная работа
	groR	AAAGTGGAGGGCTCATCGTG		
<i>licB</i>	LicBF	ATCGAACTGCTTTCAGTCAAAGAGC	1487	Данная работа
	LicBR	ACGCTCTCTCAGTTCGGAAACC		
–	BOXAIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	–	Versalovic et al., 1994
–	(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	–	

инозит, маннит, ацетат и цитрат натрия добавляли в среду M9 в концентрации 1–2 г/л. В работе использовали коммерческие препараты ампициллина в концентрации 100 мкг/мл, канамицина – от 25 до 150 мкг/мл, изопротил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) – 1 ммоль/л, 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид (X-Gal) – 50 мкг/мл.

Физиолого-биохимические методы. Согласно общепринятым методикам, изложенным в руководстве Lanуi (1987), клетки окрашивали по Граму, определяли наличие эндоспор, способность продуцировать каталазу, оксидазу (в тесте с тетраметил-*n*-фенилендиамином), нитрат- и нитрит-редуктазы, H₂S, а также гидролизовать казеин, желатин, крахмал, карбоксиметилцеллюлозу и твин-80. Исследовали рост бактерий в диапазоне температур 4–55°C, солёности 0–14% NaCl и значений pH от 4.0 до 12.0. Устойчивость к УФ-излучению определяли по росту бактерий при высеве 100 мкл культуры бактерий (10⁸ КОЕ/мл) на среде LB после облучения УФ-лампой ДБ-15 (254 нм) в дозе 2700 Дж.

Биодеградация нефти. Для количественной оценки эффективности деструкции нефти бактерии культивировали в жидкой минеральной среде M9 с аэрацией в течение 30 сут при температуре 4°C и в течение 14 сут при температурах 28 и 37°C. В качестве единственного источника углерода добавляли нефть в концентрации 4 об. %. Для оценки абиотической убыли нефти использовали стерильную среду M9 с добавлением того же количества нефти. Остаточные нефтепродукты экстрагировали трихлорметаном, их количество оценивали гравиметрическим методом (Другов, Родин, 2009). Утилизацию нефти бактериями-деструкторами определяли с учетом абиотической деградации. Для ста-

тистической обработки данных использовали пакет программы Microsoft Excel.

Молекулярно-биологические методы. Тотальную ДНК выделяли методом, приведенным в работе (te Reile et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit производства “Thermo Scientific” (ЕС).

Для амплификации использовали *Pfu* или *Taq* ДНК-полимеразу производства “Thermo Scientific” (ЕС) и специфические для каждой детерминанты праймеры производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала: 100–300 нг ДНК, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.25 мкмоль/л каждого праймера, 1.5 ммоль/л MgCl₂, 2.5 ед. *Pfu* ДНК-полимеразы или 1.25 ед. *Taq* ДНК-полимеразы и соответствующий для каждой полимеразы буфер. Полученные продукты визуализировали с помощью электрофореза в 0.7% агарозном геле (Маниатис, и соавт., 1984).

Для амплификации фрагментов генов 16S рРНК использовали *Pfu* ДНК-полимеразу и праймеры 8f и 1492r (табл. 2) в следующем режиме: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 53°C – 30 с, 72°C – 3 мин (30 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента гена *rpoC* использовали *Pfu* ДНК-полимеразу и праймеры groF и groR (табл. 2) в следующем режиме: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 3 мин (30 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента гена *alkB* использовали *Pfu* ДНК-полимеразу и праймеры alk-H1F и alk-H3R (табл. 2) в следующем режиме: 95°C – 3 мин (1 цикл); 94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин

(5 циклов); 94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента оперона *groELS* использовали *Taq* ДНК-полимеразу и праймеры *groF* и *groR* (табл. 2) в следующем режиме: 95°C – 3 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 54°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 20 с (25 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации гена *licB* использовали *Taq* ДНК-полимеразу и праймеры *LicBF* и *LicBR* (табл. 2) в следующем режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 1.5 мин (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Полученные фрагменты очищали с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit производства “Jena Bioscience” (Германия) и клонировали в составе векторов pJET1.2, pUC19 или pTZ57R/T “Thermo Scientific” (ЕС).

Фингерпринт-анализ осуществляли с использованием праймеров BOX A1R, (GTG)₅ (табл. 2). ПЦР реакцию с праймером BOX A1R и *Taq* ДНК-полимеразой проводили в следующем режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 45°C – 1 мин, 72°C – 2 мин (35 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл). ПЦР реакцию с праймером (GTG)₅ с использованием *Taq* ДНК-полимеразы проводили в режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 40°C – 1 мин, 72°C – 2 мин (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл). Визуализацию ампликонов осуществляли с помощью гель-электрофореза в агарозном геле (0.7-0.8%) (Маниатис и соавт., 1984).

Рестриктию тотальной и плазмидной ДНК с последующим лигированием осуществляли с использованием ферментов производства “Thermo Scientific” (ЕС) в условиях, предложенных фирмой-изготовителем. Тотальную ДНК и вектор pJET1.2 обрабатывали рестриктазой *EcoRV*, вектор pUC19 – рестриктазой *SmaI*. Рестриктонный анализ проводили с использованием рестриктаз производства “Thermo Scientific” (ЕС) согласно рекомендациям производителя. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли с помощью электрофореза в 0.7% агарозном геле.

Лигирование векторных молекул с очищенными продуктами амплификации и фрагментами геномной ДНК осуществляли с помощью T4 ДНК-лигазы, придерживаясь рекомендаций фирмы-изготовителя “Thermo Scientific” (ЕС).

Трансформацию бактерий *E. coli* XL1-Blue осуществляли согласно методу, приведенному в работе Маниатис и соавт. (1984).

Для постановки секвенирующей реакции использовали набор DNA Cycle Sequencing Kit (для секвенирования по Сэнгеру) (“Jena Bioscience”, Германия) и стандартные праймеры pJET1.2 forward, pJET1.2 reverse, M13 Forward IRDye 800, M13 Reverse IRDye 700. Сиквенс осуществляли с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA

Analyzer, “Li-COR” (США). Полученные результаты анализировали с помощью программ eSeq Version 3.1 “Li-COR” (США), BLASTN2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1990).

Нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных ГенБанк NCBI под номерами KU740191–KU740198, KX025126–KX025130, KU886577–KU886581, KU663051, KU376260–KU376262, KU664326, KX002016, KX011136, MG264513–MG264518, MN011828–MN011833.

Филогенетический анализ осуществляли с помощью программы MEGA4 (Tamura et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием метода накопительных культур (среда М9 с 0.1% гексадекана) из проб почв, загрязненных нефтью или продуктами ее переработки, отобранных на территориях Ливии, Ирака, Беларуси и Антарктиды, были выделены чистые культуры микроорганизмов (табл. 1). Для идентификации бактерий использовали физиолого-биохимический и молекулярно-генетический анализ.

На основании анализа последовательностей гена 16S рРНК было определено таксономическое положение ряда изолятов, отнесенных к *Bacillus flexus* 6-3, *Pseudomonas stutzeri* 15-3А и *Acinetobacter radioresistens* (штаммы 5Ab, L5A-16), выделенных из почв Ливии, и *B. licheniformis* FD9, изолированного из почв Ирака. Видовая принадлежность бактерий *B. flexus* 6-3, *B. licheniformis* FD9 и *P. stutzeri* 15-3А была подтверждена дополнительным сиквенс-анализом отдельных хромосомных детерминант и результатами физиолого-биохимических тестов (табл. 3). Штаммы 5Ab и L5A-16, отнесенные к *A. radioresistens*, проявляли устойчивость к ультрафиолетовому облучению, что наряду с другими свойствами является характерной особенностью бактерий этого вида.

Последовательности генов 16S рРНК штаммов А36-1, А36-3 имели 97% сходства с соответствующим геном бактерии *Alkanindiges illinoisensis*. Оба исследуемых изолята не росли на полноценных средах без углеводов, не использовали в качестве источников углерода углеводы, спирты, ацетат и цитрат натрия, что является отличительной особенностью представителей этого рода (Bogan et al., 2003; Woo et al., 2005) (табл. 3). Род *Alkanindiges* описан относительно недавно и включает всего два вида *A. illinoisensis* и *A. hongkongensis* (Bogan et al., 2003; Woo et al., 2005). Учитывая невысокую степень сходства генов 16S рРНК штаммов А36-1 и А36-3 с таковыми известными видами, не исключена возможность их принадлежности к новому виду рода *Alkanindiges*, вследствие чего они определены как *Alkanindiges* sp. А36-1 и *Alkanindiges* sp. А36-3.

Таблица 3. Идентификация и физиолого-биохимические свойства выделенных бактерий

Штамм	Ген	Номер депонента в GenBank NCBI (размер, п. н.)	Ближайший родственный организм в GenBank NCBI (номер депонированной последовательности)	Сходство, %	Физиолого-биохимические свойства штаммов	Таксономическая принадлежность
GP1	16S рНК	KU740191 (1055)	<i>R. oracus</i> (LN827919.1), <i>R. wratislaviensis</i> : (NR_026524.1), <i>R. imtechensis</i> (NR_042946.1)	98	Грамположительный, не образует спор, каталазо-положительный, оксидазоотрицательный, не гидролизует крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, желатин, твин-80 и мочевину; продуцирует сероводород, нитратредуктазу; использует глюкозу, сахарозу, арабинозу, ксилозу, лактозу, мальтозу, сорбит, инозит; растет в интервале 18–28°C, pH 5.0–10.0, до 3% NaCl.	<i>Rhodococcus oracus</i>
	<i>rpoC</i>	KX025128 (778)	<i>R. percolatus</i> (KF410540.1), <i>R. oracus</i> (KF410529.1)	>99		
	<i>groEL</i>	MG264516 (446)	<i>R. oracus</i> (CP009111.1)	>99		
	<i>yfhM</i>	MN011830 (583)	<i>R. oracus</i> (CP009111.1)	98		
	16S рНК	KU663051 (1052), KU740193 (671), KU664326 (1046), KU740194 (1010), KU740192 (950)	<i>R. pyridinivorans</i> (NR_025033.1), <i>R. biphenylivorans</i> (NR_134798.1), <i>R. rhodochrous</i> (LT906450.1)	>99		
5Ap	<i>alkB</i>	MN011828 (499)	<i>R. pyridinivorans</i> (CP006996.1)	99	Грамположительные, не образуют спор, каталазо-положительные, оксидазоотрицательные, не гидролизуют крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, желатину, мочевину; гидролизуют твин-80, продуцируют сероводород, нитратредуктазу; используют в качестве источника углерода глюкозу, сахарозу, ширилин-растет при 18–45°C, до 7% NaCl; pH 6.0–10.0 (штаммы 5Ap, 7A-3A-2 до pH 11.0).	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
	<i>groES</i>	MG264514 (303)	<i>R. pyridinivorans</i> (CP006996.1)	100		
	<i>groEL</i>	MG264513 (1611)	<i>R. pyridinivorans</i> (CP006996.1), <i>R. rhodochrous</i> (LT906450.1)	>99		
8A-3A	<i>nirB</i>	MN011831 (168)	<i>R. pyridinivorans</i> (CP006996.1)	98		
	<i>rpoC</i>	KX025127 (328), KX025126 (409)	<i>R. rhodochrous</i> (KF410546.1), <i>R. pyridinivorans</i> (KF410545.1)	99		

Таблица 3. Продолжение

Штамм	Ген	Номер депонента в GenBank NCBI (размер, п.н.)	Ближайший родственный организм в GenBank NCBI (номер депонированной последовательности)	Сходство, %	Физиолого-биохимические свойства штаммов	Таксономическая принадлежность
A2-h2	16S рНК	KU886577 (769)	<i>R. qingshengii</i> (NR_043535.1), <i>R. degradans</i> (JQ776649.2)	99	Грамположительные, не образуют спор, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, не гидролизуют крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, желатин, твин-80; гидролизуют мочевины, не продуцируют сероводород; используют глюкозу, сахарозу, сорбит и инозит, устойчивы к канамизину . растут при 4–28°C , концентрации NaCl до 5%, pH от 5.0 до 10.0 (A2-h2) или 12.0 (A29-k1). Штамм A2-h2 продуцирует нитритредуктазу.	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
			<i>R. baikourensis</i> (NR_024784.1), <i>R. erythropolis</i> (NR_119125.1)	98		
		KX025129 (677), KX025130 (694)	<i>R. erythropolis</i> (CP007255.1)	99		
A2-h2, A29-k1	<i>groC</i>	MG264517 (413), MG264518 (421)	<i>R. erythropolis</i> (CP007255.1)	99		
10-15	16S рНК	KU886581 (660)	<i>Dietzia sinnamea</i> (NR_042390.1), <i>D. papillomatosis</i> (NR_043065.1)	97	Грамположительный, не образует спор, колонины ярко-оранжевые , катазоположительный, оксидазоотрицательный, не гидролизует крахмал, карбоксиметилцеллюлозу , желатин; гидролизует твин-80, мочевины; использует глюкозу и сахарозу, продуцирует сероводород, нитрат- и нитритредуктазу; растет при 28–37°C, pH 6.0–12.0, 10% NaCl	<i>Dietzia</i> sp.
6-3	16S рНК	KU740197 (621)	<i>Bacillus flexus</i> (NR_024691.1)	98	Грамположительные спорообразующие палочки, катазоположительный, оксидазоотрицательный, гидролизует крахмал, казеин, твин-80, желатин, не продуцирует сероводород; использует глюкозу, сахарозу, Д-ксилозу, рибозу, лактозу, мальтозу, целлобиозу, сорбит, инозит и арабинозу; растет при 18–50°C; pH 6.0–11.0; до 5% NaCl	<i>Bacillus flexus</i>
			Фрагмент хромосомы	<i>B. flexus</i> (CP016790.1)		
FD9	16S рНК	KX002016 (415)	<i>B. licheniformis</i> (KX785171.1)	97	Грамположительные спорообразующие палочки, катазоположительный, оксидазоположительный; гидролизует крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, казеин; не продуцирует сероводород; использует глюкозу, сахарозу, Д-ксилозу, рибозу, лактозу, мальтозу, целлобиозу, сорбит и инозит; продуцирует нитратредуктазу; растет при 28–55°C; pH 4.0–12.0; до 10% NaCl	<i>Bacillus licheniformis</i>
			<i>licB</i>	<i>B. licheniformis</i> (AE017333.1)		

Таблица 3. Окончание

Штамм	Ген	Номер депонента в GenBank NCBI (размер, п.н.)	Ближайший родственный организм в GenBank NCBI (номер депонированной последовательности)	Сходство, %	Физиолого-биохимические свойства штаммов	Таксономическая принадлежность
A2-6	16S рРНК	KU886578 (735)	<i>Deinococcus caeni</i> (NR_043473.1), <i>D. indicus</i> (NR_118357.1), <i>D. aquaticus</i> (NR_043472.1)	98	Грамположительные, устойчивые к УФ-облучению . катазоположительные, оксидазотрицательные палочки; не гидролизует крахмал , желатин и твин-80; гидролизует карбоксиметилцеллюлозу , казеин, мочевину ; использует мальтозу; растет при 10–37°C ; pH 6.0–8.0 ; до 3% NaCl	<i>Deinococcus</i> sp.
A36-1 A36-3	16S рРНК	KU740195 (1497), KU740196 (795)	<i>Alkanindiges illinoisensis</i> (NR_025254.1)	95 97	Грамотрицательные палочки, катазоположительные, оксидазотрицательные, не растут на полноценных средах, не используют глюкозу, сахарозу, лактозу, маннит, мальтозу, инозит, сорбит, цитрат и ацетат натрия; используют гексадекан, дизельное топливо, керосин ; растут при 4–28°C; pH 5.0–9.0; до 3% NaCl. <i>Alkanindiges</i> sp. A36-3 гидролизует твин-80.	<i>Alkanindiges</i> sp.
5Ab, L5A-16	16S рРНК	KU886580 (748), KU886579 (761)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> (NR_114074.1)	98	Грамотрицательные палочки, катазоположительные, оксидазотрицательные, гидролизуют твин-80, продуцируют нитрат- и нитритредуктазу, устойчивы к УФ-облучению; растут при 10–42°C; pH 5.0–11.0; до 5% NaCl.	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
15-3A	16S рРНК	KU740198 (476)	<i>P. stutzeri</i> (NR_103934.1)	98	Грамотрицательные оксидазоположительные, катазоположительные, микроаэрофильные нефлюоресцирующие палочки; продуцирует нитратредуктазу, гидролизует крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, твин-80; утилизируют глюкозу, сахарозу, мальтозу, сорбит, арабинозу, инозит; растет при 4–42°C; pH 5.0–10.0; до 5% NaCl.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>alg</i>	MN011833 (962)	<i>P. stutzeri</i> (CP011854.1)	97		

Примечание. * Для бактерий, идентифицированных как *Rhodococcus rubiginosus*, определяли нуклеотидные последовательности ампликонов, полученных в ПЦР-реакции с использованием в качестве матриц тотальной ДНК отдельных штаммов (ампликоны, полученные с использованием в качестве матрицы остальных штаммов, имели идентичные рестрикционные профили). Ключевые свойства штаммов выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Из пробы антарктического грунта выделен штамм А2-6, устойчивый к высоким дозам ультрафиолетового облучения. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК этого штамма имела одинаковое сходство (98%) с соответствующими генами бактерий *D. caeni*, *D. aquaticus* и *D. indicus*. Однако по ряду физиолого-биохимических свойств штамм А2-6 отличался от типовых штаммов этих видов (Bergey's, 2012a). В частности, штамм А2-6 не гидролизировал крахмал, но метаболизировал мочевины, обладал более низким температурным минимумом роста (10°C) и диапазоном рН 6.0–8.0 (табл. 3). Выявленные физиолого-биохимические свойства штамма А2-6 дают основание предположить, что он является новым видом рода *Deinococcus*.

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК бактерий родов *Dietzia* (штаммы 10-15) и *Rhodococcus* (штаммы AL18, 5Ap, 7A-3A-2, 8A-3A, 15-4A, A31-2d, GP1, A2-h2, A29-k1) имели одинаковое сходство (98–99%) с генами 16S рРНК бактерий разных видов, что не позволило идентифицировать их до вида (табл. 3).

Последовательность гена 16S рРНК штамма 10-15, имела 97% сходства с соответствующими генами двух близкородственных видов *D. cinnamomea* и *D. papillomatosis*. Однако физиолого-биохимический анализ выявил у штамма целый ряд признаков, отличающих его от типичных представителей этих видов (Bergey's, 2012b). В частности, штамм 10-15 формировал колонии, окрашенные в ярко-оранжевый цвет, рос при температурах от 28 до 37°C в интервале рН от 6 до 12 в присутствии 10% NaCl, не гидролизировал крахмал и целлюлозу (табл. 3). Наличие ряда дифференцирующих признаков и низкий уровень сходства гена 16S рРНК (97%) с генами бактерий *D. cinnamomea* и *D. papillomatosis* свидетельствует о принадлежности штамма 10-15 к новому виду, в связи с чем он был определен как *Dietzia* sp. 10-15.

Для уточнения таксономического положения бактерий рода *Rhodococcus* дополнительно определяли нуклеотидные последовательности генов *rpoC*, *groELS*, *alkB*, а также случайных фрагментов хромосомы.

Для идентификации штамма GP1 сиквенс-анализ генов *rpoC* оказался не информативным (табл. 3). Видовая принадлежность штамма GP1 была установлена на основании определения нуклеотидной последовательности гена *groEL* и случайного фрагмента хромосомы (детерминанты *yfhM*). Секвенированные последовательности данных детерминант проявляли сходство с таковыми бактерий *R. opacus* (до 99%), что позволило отнести бактерии штамма GP1 к виду *R. opacus*.

Штаммы А2-h2 и А29-k1, выделенные из проб антарктического грунта, были идентифицированы как *R. erythropolis* на основании анализа генов

rpoC и *groES* (рис. 1А, 2А). При этом рестрикционный анализ генов *rpoC* с использованием ферментов *AatII* и *SacI* (данные не представлены) и сиквенс-анализ генов *groES* позволили дифференцировать их от филогенетически близких видов *R. qingshengii*, *R. degradans*, *R. baikonuriensis*. Следует отметить, что рестрикционный анализ генов *rpoC* может быть использован для быстрой идентификации бактерий *R. erythropolis*. Например, при рестрикции гена *rpoC* ферментами *AatII* и *SacI* образуются фрагменты, характерные для представителей этого вида (соответственно, размером 832; 249; 155 п.н. и 700; 248; 165; 123 п.н.) (установлено на основании биоинформатического анализа последовательностей, депонированных в GenBank NCBI; данные не представлены).

Сиквенс-анализ генов *rpoC* и *groELS* (рис. 1А, 2) бактерий штаммов AL18, 5Ap, 7A-3A-2, 8A-3A, 15-4A, A31-2d не позволил определить их видовую принадлежность, поскольку эти детерминанты идентичны у бактерий видов *R. pyridinivorans* и *R. rhodochrous*. Анализ нуклеотидных последовательностей случайных фрагментов хромосомы и генов *alkB* (рис. 1Б), кодирующих алкан-1-монооксигеназы, позволил отнести их к виду *R. pyridinivorans*. При этом все исследованные штаммы обладали отличительными физиолого-биохимическими свойствами (росли при 45°C и утилизировали пиридин) (Yoon et al., 2000).

Таким образом, в результате проведенного анализа были идентифицированы углеводородокисляющие бактерии, выделенные из почв и грунта географически удаленных регионов (Ливия, Ирак, Антарктида и Беларусь). Большинство изолятов были отнесены к близкородственным родам *Rhodococcus* и *Dietzia* (класс *Actinobacteria*). Широкое распространение микроорганизмов этой таксономической группы является весьма закономерным, поскольку их геномы содержат большое количество детерминант, определяющих окисление широкого ряда органических соединений (Larkin et al., 2005; Larkin et al., 2010; Martinkova et al., 2009).

Для бактериальных штаммов, относящихся к одним и тем же видам, был исследован внутривидовой полиморфизм. В результате сравнительного физиолого-биохимического и фингерпринт-анализа (рис. 3) было показано, что все исследованные штаммы имеют отличительные особенности. Генетический полиморфизм выявлен для представителей видов *R. erythropolis* (рис. 3В) и *A. radioresistens* (рис. 3Г) (в ПЦР реакции с праймером BOX A1R выявлены ампликоны разного размера). Следует отметить, что оба штамма (А2-h2 и А29-k1), принадлежащие к виду *R. erythropolis*, были выделены из проб антарктического грунта, а штаммы 5Ab и L5A-16 *A. radioresistens* — из ливийской почвы. Штаммы *R. erythropolis* различа-

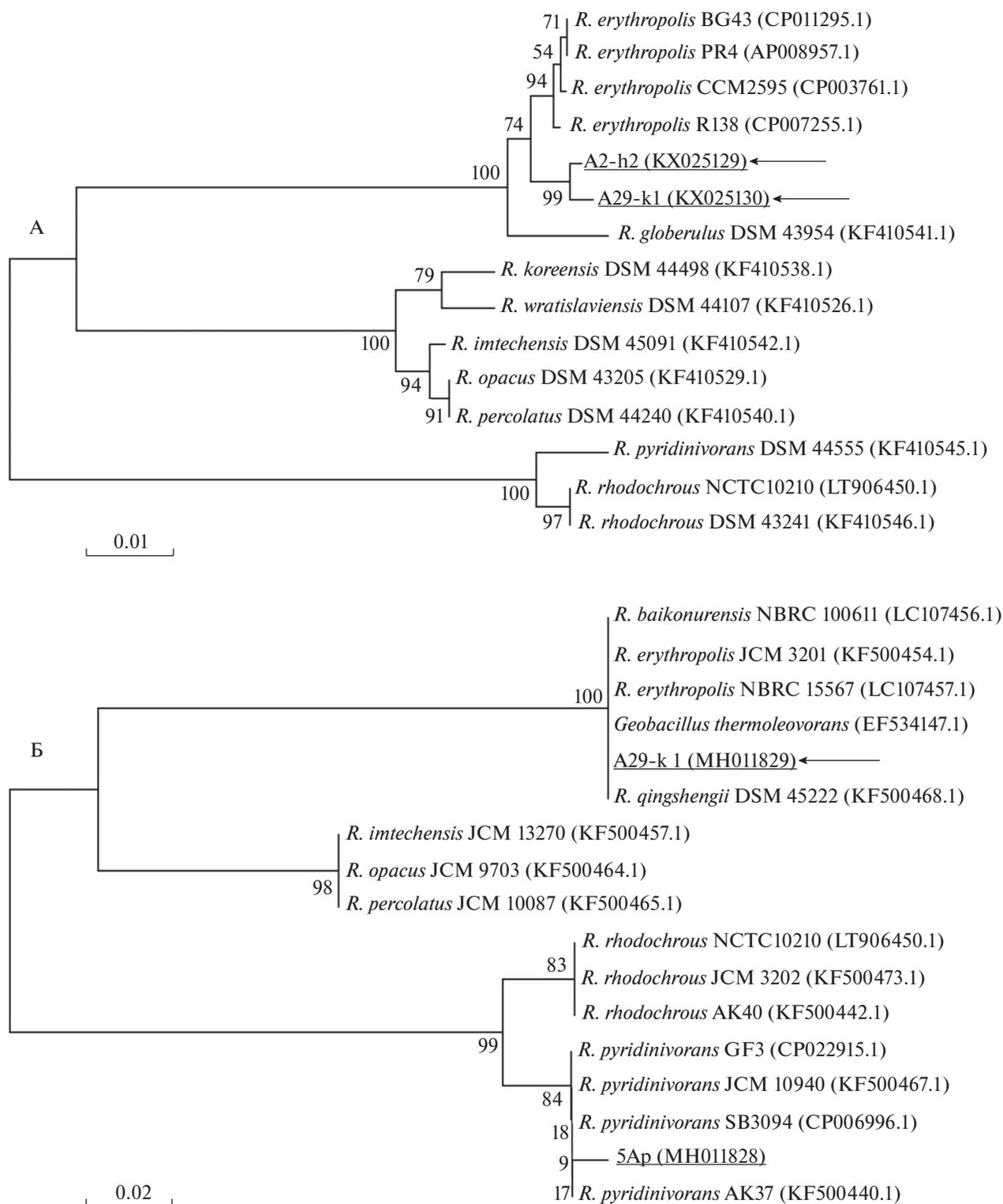


Рис. 1. Филогенетические деревья, построенные на основании сравнения нуклеотидных последовательностей генов *groC* (А) и *alkB* (Б) бактерий рода *Rhodococcus*. Исследованные штаммы подчеркнуты и обозначены стрелкой, в скобках указан номер нуклеотидной последовательности в базе данных GenBank NCBI.

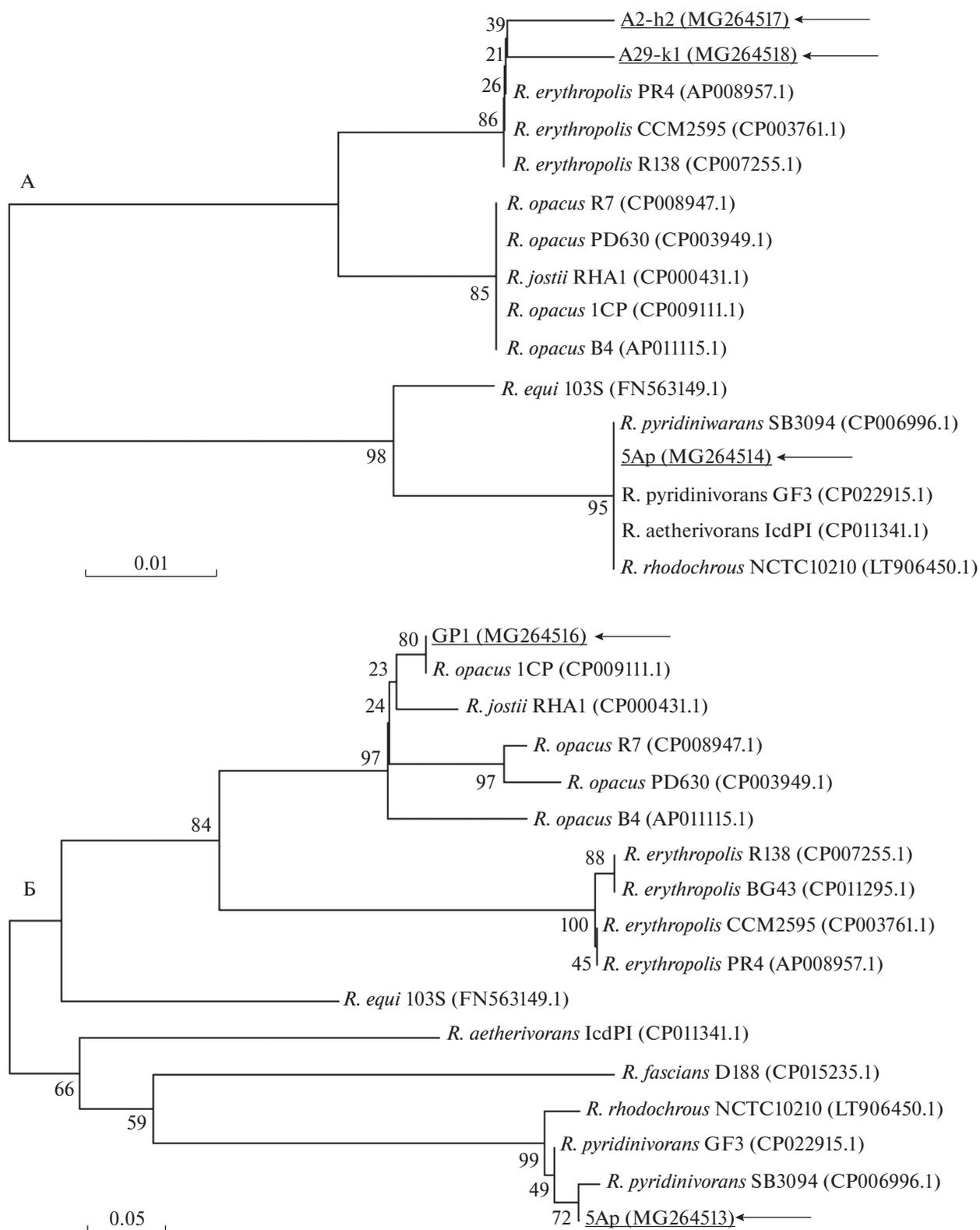


Рис. 2. Филогенетические деревья, построенные на основании сравнения нуклеотидных последовательностей генов *groES* (А) и *groEL* (Б) бактерий рода *Rhodococcus*. Исследованные штаммы подчеркнуты и обозначены стрелкой, в скобках указан номер нуклеотидной последовательности в базе данных GenBank NCBI.

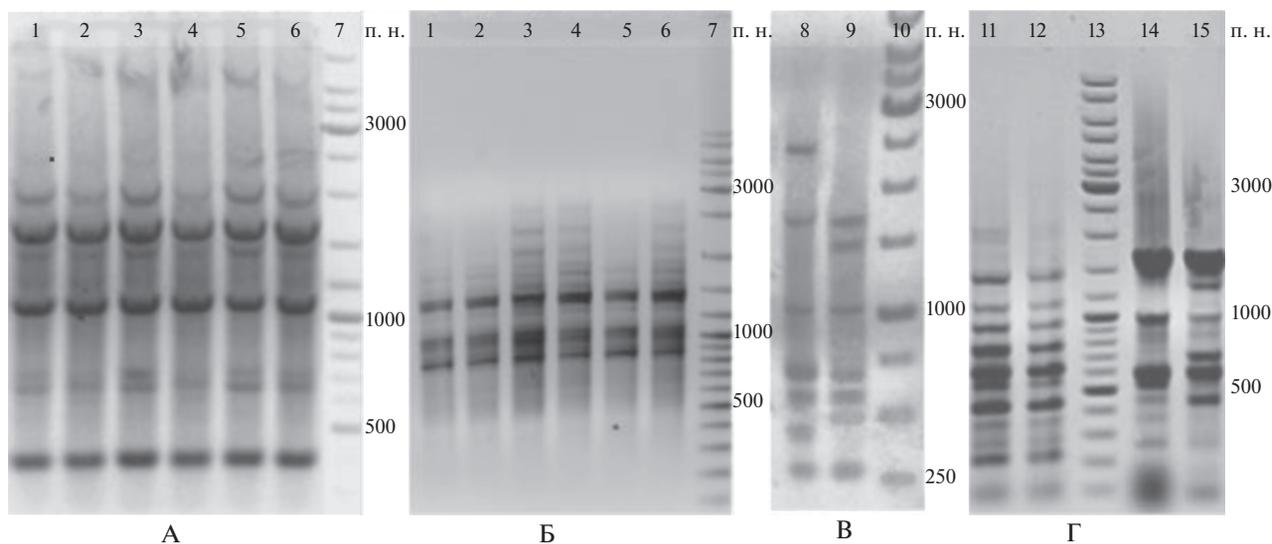


Рис. 3. Электрофореграмма результатов фингерпринт-анализа с использованием праймеров BOX A1R (А, В, Г) и (GTG)₅ (Б) бактерий: 1 – *R. pyridinivorans* AL18; 2 – *R. pyridinivorans* 5Ap; 3 – *R. pyridinivorans* 7A-3A-2; 4 – *R. pyridinivorans* 8A-3A; 5 – *R. pyridinivorans* 15-4A; 6 – *R. pyridinivorans* A31-2d; 8 – *R. erythropolis* A2-h2; 9 – *R. erythropolis* A29-k1; 11 – *Alkanindiges* sp. A36-1; 12 – *Alkanindiges* sp. A36-3; 14 – *Acinetobacter radioresistens* 5Ab; 15 – *Acinetobacter radioresistens* L5A-16. 7 – маркер DNA Ladder Mix, 10 – маркер 1 kb DNA Ladder (“Thermo Scientific”, EC).

лись также интервалом рН для роста. Штамм *R. erythropolis* A2-h2 рос в среде со значениями рН от 5.0 до 10.0 с оптимумом в нейтральной области (рН 7.0-8.0), тогда как штамм *R. erythropolis* A29-k1, несмотря на способность расти при более высоких значениях рН (до 12.0), имел оптимум при более низких значениях рН (5.0-6.0). Кроме того штамм *R. erythropolis* A2-h2 продуцировал нитрит-редуктазу, а также обладал более широким спектром используемых субстратов и эффективно деградировал нефть в жидкой среде при пониженной температуре (4°C) (табл. 4). Для штаммов *A. radioresistens* физиолого-биохимических отличий выявлено не было (табл. 3, 4).

Представители *Alkanindiges* sp. (штаммы А36-1 и А36-3) характеризовались генетической однородностью (рис. 3Г), однако один из штаммов (штамм А36-1) дополнительно использовал бифенил в качестве источника углерода и энергии (табл. 4).

Особый интерес представляли бактерии, идентифицированные как *R. pyridinivorans*, выделенные из регионов с резко отличными климатическими условиями (Ливия, Антарктида и Беларусь). Несмотря на генетическую однородность (рис. 3А, 3Б), физиолого-биохимический анализ позволил выявить отличия между ними по спектру используемых субстратов (всего проверено 22 соединения). Например, только бактерии штамма *R. pyridinivorans* 5Ap могли использовать в качестве источника углерода 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, а штаммы *R. pyridinivorans* 7A-3A-2, 15-4A и А31-2d в отличие от остальных не утилизирава-

ли *m*- и *n*-ксилолы (табл. 4). Во-вторых, штаммы отличались по способности расти при высоких значениях рН среды. Только штаммы *R. pyridinivorans* 5Ap и 7A-3A-2 росли при рН 11.0 (табл. 3). И, наконец, штаммы *R. pyridinivorans* отличались между собой эффективностью утилизации нефти. Наибольшей деградативной способностью характеризовались бактерии штамма *R. pyridinivorans* 5Ap, способные утилизировать более 50% нефти в жидкой среде в течение 14 сут. При этом штамм *R. pyridinivorans* 5Ap эффективно утилизировал нефть при повышенной температуре культивирования: 37°C (табл. 4) и 45°C (Патент РФ, 2017).

Таким образом, результаты определения внутривидового разнообразия бактерий родов *Rhodococcus* и *Dietzia* свидетельствуют о необходимости изучения физиолого-биохимических свойств бактерий, а не только молекулярной идентификации штаммов при выборе бактерий для практического использования в биотехнологиях биоремедиации от нефтяных загрязнений.

Способность исследованных бактерий-деструкторов противостоять стрессовым факторам (экстремальные значения температуры, осмолярности, рН и радиации), вероятно, обусловлена особенностями условий их местообитания. Например, из проб почв, отобранных в регионах с жарким климатом (Ливия, Ирак), были выделены грамположительные спорообразующие бактерии *B. flexus* 6-3 и *B. licheniformis* FD9, способные расти при высокой температуре (до 55°C), высоких и низких значениях рН среды (от 4.0 до 12.0), большой концентрации NaCl (до 10%). Достаточно показа-

Таблица 4. Спектр субстратов, используемых бактериями – деструкторами углеводов

Штаммы	Деградация нефти (%) при температуре			Углеводородные субстраты***
	4°C*	28°C**	37°C**	
<i>R. opacus</i> GP1	0	11.70 ± 0.28	0	K, DF, H, N, Hmn, Hd, E, Ph, T, Nah, A, Phn, Prn
<i>R. pyridinivorans</i> AL18	0	26.85 ± 0.07	2.90 ± 0.70	K, DF, H, N, Hd, Ox, Mx, Px, B, T, E, Ph, Nah, A, Phn, Flu, Pyr, Biph, Prn
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	0	59.79 ± 8.20	55.56 ± 3.11	K, DF, H, N, Hmn, Hd, Ox, Mx, Px, B, T, E, Ph, Nah, A, Phn, Flu, Pyr, Biph, Prn
<i>R. pyridinivorans</i> 7A-3A-2	0	35.54 ± 0.29	1.30 ± 0.13	K, DF, H, N, Hd, Ox, B, T, E, Ph, Nah, A, Phn, Flu, Pyr, Biph, Prn
<i>R. pyridinivorans</i> 8A-3A	0	22.75 ± 2.48	12.52 ± 2.48	K, DF, H, N, Hd, Ox, Mx, Px, B, T, E, Ph, Nah, A, Phn, Flu, Pyr, Biph, Prn
<i>R. pyridinivorans</i> 15-4A	0	2.86 ± 0.14	12.95 ± 0.12	K, DF, H, N, Hd, Ox, B, T, E, Ph, Nah, A, Phn, Flu, Pyr, Biph, Prn
<i>R. pyridinivorans</i> A31-2d	0	33.21 ± 0.27	2.66 ± 0.27	K, DF, H, N, Hd, Ox, B, T, E, Ph, Nah, A, Phn, Flu, Pyr, Biph, Prn
<i>Dietzia</i> sp. 10-15	0	12.93 ± 0.81	0	K, DF, H, N, Hd, Ph
<i>B. flexus</i> 6-3	0	5.30 ± 1.70	3.40 ± 1.40	K, H, N, Hmn, Hd, Ox, Mx, B, T, E, Ph, A, Phn, Pyr, Biph
<i>B. licheniformis</i> FD9	0	0	0	K, H, N, Hmn, Hd, Ox, Mx, B, T, E
<i>Deinococcus</i> sp. A2-6	0	6.72 ± 1.53	3.22 ± 3.42	H, N
<i>P. stutzeri</i> 15-3A	0	0	0	H, N, Hmn, Hd, Ph, T, B, A, Phn, Biph, Pyr, NA
<i>Alkanindiges</i> sp.A36-1	0	0	0	K, DF, Hd, Biph
<i>Alkanindiges</i> sp. A36-3	0	0	0	K, DF, Hd
<i>A. radioresistens</i> 5Ab	0	16.23 ± 6.21	0	K, DF, Hd, A
<i>A. radioresistens</i> L5A-16	0	19.24 ± 3.33	0	K, DF, Hd, A
<i>R. erythropolis</i> A2-h2	49.87 ± 2.81	23.81 ± 2.68	0	K, DF, H, N, Hmn, Hd, Ox, B, T, E, Ph, A
<i>R. erythropolis</i> A29-k1	6.40 ± 5.74	31.54 ± 5.48	0	K, DF, H, N, Hd, Ox, T, E, Ph, A

* Эффективность деградации нефти определяли через 30 сут;

** Эффективность деградации нефти определяли через 14 сут;

*** К – керосин, DF – дизельное топливо, Н – гексан, N – нонан, Hmn – 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилюнонан, Hd – гексадекан, Ox – *o*-ксилол, Mx – *m*-ксилол, Px – *n*-ксилол, B – бензол, T – толуол, E – этилбензол, Ph – фенол, Nah – нафталин, A – антрацен, Phn – фенантрен, Flu – флюорен, Prg – пирен, Biph – бифенил, Prn – пиридин, NA – нафтиламин.

тельно, что из почв Ливии выделен штамм *P. stutzeri* 15-3A, растущий при температуре 42°C, что не характерно для других представителей этого вида (Lalucat et al., 2006). Штамм *Dietzia* sp. 10-15 рос в присутствии 10% NaCl в среде, а штамм *R. pyridinivorans* 5Ap эффективно деградировал нефть при повышенной температуре (Патент РФ, 2017). Из почв Ливии и Антарктиды, подверженных высокой солнечной радиации, выделены бактерии-деструкторы, устойчивые к действию ультрафиолетового облучения (*Deinococcus* sp. A2-6 и *A. radioresistens* 5Ab, *A. radioresistens* L5A-16).

Практически все штаммы, выделенные из проб антарктического грунта, росли при пониженной температуре (4°C). При этом бактерии *R. erythropolis* A2-h2 и A29-k1 характеризовались более низким температурным максимумом роста (до 28°C) в отличие от большинства представителей этого вида, растущих при температуре до 40°C (Bergey's, 2012b). Штамм *R. erythropolis* A2-h2 характеризовался более широким спектром утилизируемых субстратов и способностью эффективно деградировать нефть при температуре 4°C (табл. 3). Определенный интерес представляют штаммы облигатных алканотрофов *Alkanindiges*

сп. Поскольку данные микроорганизмы не способны расти без углеводов, их присутствие в природных почвенных микробиоценозах, безусловно, положительно влияет на процессы биоремедиации территорий, загрязненных этими соединениями (Fuentes et al., 2016). Штамм *Alkanindiges* sp. A36-1 помимо алифатических углеводов утилизировал полициклическое ароматическое соединение – бифенил.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что бактерии-деструкторы, выделенные из географически удаленных регионов, характеризуются генетическим и физиолого-биохимическим разнообразием и обладают рядом отличительных особенностей, позволяющих им существовать в экстремальных условиях внешней среды. Наличие адаптационных свойств у изолированных бактерий создает необходимые предпосылки их использования для очистки окружающей среды от опасных углеводов в условиях, далеких от физиологической нормы.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б16Р-082) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № Бел_а 16-54-00200).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство / 2-е изд., перераб. и доп. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 270 с.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Пер. с англ.: Зографа Ю.Н. [и др.]; под ред. и с предисл. Алиханяна С.И. М.: Мир, 1976. 436 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Пер. с англ. под ред.: Баева А.А., Скрябина К.Г.. М.: Мир, 1984. 479 с.
- Патент РФ. 2017. № 2617941.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. I. 3. P. 403–404.
- Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists // *ASM News.* 1994. V. 60. P. 360–365.
- Bell K.S., Kuyukina M.S., Heidbrink S., Philp J.C., Aw D.W.J., Ivshina I.B., Christofi A. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR // *J. Appl. Microbiol.* 1999. V. 87. P. 472–480.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: V. 1: The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria / Eds. Boone D.R., Castenholz R.W. Springer Science & Business Media: Science, 2012a. 722 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 5: The *Actinobacteria* / Eds. Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K. Springer Science & Business Media: Science, 2012b. 2083 p.
- Bogan B.W., Sullivan W.R., Kayser K.J., Derr K.D., Aldrich H.C., Paterek J.R. *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1389–1395.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // *BioTechniques.* 1987. V. 5. P. 376–378.
- Chénier M.R., Beaumier D., Roy R., Driscoll B.T., Lawrence J.R., Greer C.W. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 5170–5177.
- Clarridge J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // *Clinic. Microbiol. Rev.* 2004. V. 17. № 4. P. 840–862.
- Das S., Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms // *Journal of microbiological methods.* 2014. V. 103. P. 80–100.
- Fuentes S., Barra B., Caporaso J.G., Seeger M. From rare to dominant: a fine-tuned soil bacterial bloom during petroleum hydrocarbon bioremediation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 888–896.
- Glazunova O.O., Raoult D., Roux V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 2317–2322.
- Im W.-T., Jung H.-M., Ten L.N., Kim M.K., Bora N., Goodfellow M., Lim S., Jung J., Lee S.-T. *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from fresh water, and *Deinococcus caeni* sp. nov., isolated from activated sludge // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 2348–2353.
- Lalucat J., Bannasar A., Bosch R., García-Valdés E., Palleroni N.J. Biology of *Pseudomonas stutzeri* // *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 2006. V. 70. P. 510–547.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen Ch.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. P. 282–290.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen Ch.C.R. Genomes and plasmids in *Rhodococcus*. *Biology of Rhodococcus* / Ed. by Alvarez H.M. Springer, 2010. P. 73–90.
- Martinkova L., Uhnakova B., Patek M., Nešvera J., Křen V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // *Environ. Int.* 2009. V. 35. P. 162–177.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1596–1599.
- Táncics A., Szoboszlai S., Kriszt B., Kukolya J., Baka E., Márialigeti K., Révész S. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 105. P. 1026–1033.
- Táncics A., Benedek T., Farkas M., Máthé I., Márialigeti K., Szoboszlai S., Kukolya J., Kriszt B. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA–DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 298–301.

- Táncics A., Benedek T., Szoboszlai S., Veres P.G., Farkas M., Máthé I., Máriaiget K., Kukolya J., Lanyi S., Kriszt B. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-mono-oxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus* // Syst. Appl. Microbiol. 2015. V. 38. P. 1–7.
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Yoon J.H., Kang S.S., Cho Y.G., Lee S.T., Kho Y.H., Kim C.J., Park Y.H. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 2173–2180.
- Ventura M., Canchaya C., Del Casale A., Dellaglio F., Neviani E., Fitzgerald G. F., Van Sinderen D. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2783–2792.
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // Methods Mol. Cell. Biol. 1994. V. 5. P. 25–40.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
- Woo P.C., Tse H., Lau S.K., Leung K.W., Woo G.K., Wong M.K., Yuen K.Y. *Alkanindiges hongkongensis* sp. nov. A novel *Alkanindiges* species isolated from a patient with parotid abscess // Syst. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 316–322.

Biodiversity of Hydrocarbon-Oxidizing Soil Bacteria from Various Climatic Zones

M. I. Charniauskaya¹*, A. A. Bukliarevich¹, Ya. A. Delegan², A. E. Akhremchuk¹,
A. E. Filonov², and M. A. Titok³

¹Research Laboratory of Biotechnology, Department of Microbiology, Biological Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

³Department of Microbiology, Biological Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus

*e-mail: charnymi@bsu.by

Received December 28, 2017

Abstract—Hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from soil samples from different climatic zones (Belarus, Libya, Iraq, and Antarctica) were studied. Techniques of physiological, biochemical, and molecular genetic analysis were used to identify 18 strains, most of which belonged to nonmycelial actinomycetes. Informative genetic markers used for identification of bacteria of the genus *Rhodococcus* were the genes *alkB* (for *R. pyridinivorans*), *rpoC* and *groES* (for *R. erythropolis*), *groEL* (for *R. opacus*), and random chromosome fragments (for *R. opacus* and *R. pyridinivorans*). Bacteria isolated from Libyan sandy soil and Antarctic soil and identified as *Dietzia* sp. 10-15, *Deinococcus* sp. A2-6, *Alkanindiges* sp. A36-1, and *Alkanindiges* sp. A36-3 exhibited low similarity of their 16S rRNA gene sequences to those of the closely related species and differed from them in a number of physiological and biochemical characteristics, which supported their identification as members of new species. Comparative physiological, biochemical, and fingerprint analysis of the strains belonging to the same species revealed intraspecific polymorphism. Strains capable of growth at high and low temperatures, resistant to UV-irradiation, elevated NaCl concentration, and acidic or alkaline conditions were revealed. This is the first report of oil degradation by *R. pyridinivorans* 5Ap at elevated temperature (45°C) and by *R. erythropolis* A2-h2 at 4°C.

Keywords: bacterial degraders, hydrocarbons, molecular genetic and physiological and biochemical analysis

ХИТОЗАН В БИОЛОГИИ, МИКРОБИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ И СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

© 2018 г. В. П. Варламов^{а, *}, И. С. Мысякина^б

^аИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

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

*e-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 20.04.2018 г.

Мини-обзор посвящен последним достижениям в изучении и практическом использовании хитозана и его производных в широком круге областей человеческой деятельности. Дана краткая историческая справка об открытии хитина и хитозана. Отдельное внимание уделено распространению и структуре хитозана, исследованию антимикробных свойств этого полимера и их зависимости от физико-химических характеристик хитозана: молекулярной массы и степени дезацетилирования, а также условий получения производных. Кратко рассмотрены возможные механизмы биологической активности хитозана.

Ключевые слова: хитин, хитозан, производные хитозана, антимикробная активность

DOI: 10.1134/S0026365618050178

В настоящее время Россия находится в числе ведущих стран мира не только по запасам хитина, но и по количеству и качеству научных исследований и оригинальных технологий использования хитозана и его производных. Этому в немалой степени способствовало создание в марте 2000 г. Общероссийской общественной организации “Российское Хитиновое общество”, функцией которого является координация проводимых в РФ исследований хитина и хитозана. Ретроспективно эта координационная работа началась в сентябре 1983 г., когда во Владивостоке была проведена 1 Всесоюзная конференция по хитину и хитозану. Начиная с этой даты, в России регулярно проводятся конференции, имеющие статус международных. Очередная 14-ая международная конференция “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” (www.chitin.ru), где были рассмотрены последние достижения в изучении и разнообразном практическом использовании хитина и хитозана и продуктов на их основе, проводилась в сентябре 2018 г. в г. Севастополе на базе Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского Российской академии наук (ИМБИ РАН).

Хитин был открыт во Франции более 200 лет назад в 1811 г. Анри Браконно (Henri Braconnot) при работе с высшими грибами в ботаническом саду г. Нанси. История его открытия и ранние исследования приведены в обзоре (Muzzarelli et al., 2012). Позже, в 1859 г. исследователем Роже (Rouget) было показано, что при обработке хити-

на концентрированной щелочью можно получить так называемый модифицированный хитин, растворимый в органических кислотах (Rouget, 1859), – хитозан. С тех пор к этому уникальному биополимеру проявляется большой интерес, он стал предметом исследований, удостоенных Нобелевской премии. В 1903 г. Ф. Фишер (F. Fischer) синтезировал глюкозамин, в 1929 г. П. Каррер (P. Karrer) провел ферментативную деградацию хитина хитиназами, а в 1939 г. У. Хаворт (W. Haworth) установил абсолютную конфигурацию глюкозамина.

Хитин и хитозан являются линейными полисахаридами, состоящими из различного количества 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозы (глюкозамин) и его N-ацетилированного производного в пиранозной форме, связанных β-(1 → 4) гликозидными связями. В выделенном из природных источников хитине, как правило, содержится 5–10% остатков 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозы. Дезацетилирование хитина обычно осуществляют в жестких щелочных условиях, при этом происходит его частичная деполимеризация. Проведение дезацетилирования в мягких условиях (с помощью ферментов или при низких температурах) позволяет получать хитозан с более высокой молекулярной массой. В настоящее время отсутствует общепринятое определение хитозана и хитина в зависимости от содержания N-ацетильных групп. Как правило, степень ацетилирования промышленных образцов хитозана не превышает 5–30%, а молекулярная масса (ММ) изменяется от 2–

3 млн Да и вплоть до олигомеров с ММ 2–5 кДа и менее (Немцев, 2006; Kumar, 2004; Хитозан, 2013).

Хитозан является не просто ценным биополимером, но “веществом XXI века”. Современная сфера применения хитозана и его разнообразных производных и композитов включает медицину, питание, сельское хозяйство, микробиологию, фармакологию, косметику и т.д. (Kumar, 2004; Dutta et al., 2008; Goy et al., 2009; Хитозан, 2013; Kuprina et al., 2015; Попова и соавт., 2017; Шагдарова и соавт., 2018), что обусловлено достаточно низкой ценой хитозана. Например, стоимость технического хитозана, применяемого для очистки воды, начинается с 5–10 долларов США за 1 кг, лучшие по качеству образцы со степенью дезацетилирования 90% можно купить за 30–40 долларов США, а стоимость хитозана медицинского назначения может достигать 25000 долларов США (Roberts, 2008).

Имеются три основных природных источника хитина: панцирь ракообразных, кутикула насекомых и клеточная стенка мицелиальных грибов. Обычно хитин встречается в комплексе с другими веществами. В панцире ракообразных он связан с белками и кальцием (Немцев, 2006), кутикула насекомых состоит из хитин-меланинового комплекса (Немцев и соавт., 2004). В клеточной стенке грибов хитин находится, в основном, в комплексе с β -(1 \rightarrow 3) глюканом и является основным структурным полисахаридом гиф мицелия (Феофилова, 2002а; Терешина и соавт., 1997; Мысякина и соавт., 2012; Tsigos et al., 1999; Karimi, Zamani, 2013). Клеточные стенки ряда грибов содержат как хитин, так и хитозан, который образуется под действием хитиндеацетилаз (Феофилова, 2002б; Шагдарова и соавт., 2018). В настоящее время получение хитозана из этих источников не может конкурировать с общеприменяемой технологией получения хитозана из панциря ракообразных, однако с появлением новых биотехнологий его получение из грибов, несомненно, будет конкурентоспособно в будущем (Феофилова, 2002б).

Успешному развитию работ по получению и исследованию хитина и хитозана способствуют не только широта практического применения этих биополимеров и продуктов на их основе в различных, иногда неожиданных сферах, но и те свойства, которые особенно полезны для медицинского и косметического применения: биосовместимость и биodeградебельность с образованием безопасных для организма человека веществ — N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина. Отметим также низкую токсичность хитина/хитозана, их иммуномодулирующее, антибактериальное и фунгицидное действие, адьювантные свойства, противовоспалительное и противоопухолевое действие, радиопротекторные свойства, сорбционную способность, липотропное действие, ранозаживляющие свойства, антихолестерическое, гемостатическое, антибиопленочное действие и др. (Ку-

mar, 2004; Goy et al., 2009; Glinel et al., 2013; Younes, Rinaudo, 2015).

Показано, что молекулярная масса, заряд и степень дезацетилирования оказывают существенное влияние на проявление антимикробной активности хитозана (Mellegård et al., 2011; Younes et al., 2014). Следует отметить, что строение хитозана и наличие аминогруппы позволяют проводить разнообразные химические модификации для изменения свойств этого уникального биополимера в нужном направлении (Ильина, Варламов, 2015, 2016; Ильина и соавт., 2017; Paolicelli et al., 2009; Silva et al., 2010; Xia et al., 2011; Zubareva et al., 2015; Zubareva et al., 2017; Sankov et al., 2017).

Механизм биологической активности хитозана еще в значительной степени не исследован. Полимер содержит свободные аминогруппы, которые при пониженных значениях pH обуславливают поликатионную природу молекулы. Положительный заряд позволяет молекулам хитозана взаимодействовать с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток микроорганизмов, препятствуя нормальному обмену веществ с окружающей средой. Благодаря многочисленным аминогруппам он способен хелатировать катионы металлов, вызывать частичную дезинтеграцию клеточной стенки, а также взаимодействовать с липидами мембран микроорганизмов и формировать каналы в липидном бислое, нарушая клеточную проницаемость; проникая в цитоплазму, хитозан способен ингибировать синтез белков, взаимодействуя с РНК и ДНК (Куликов, Хайруллин, 2013).

В настоящем номере журнала “Микробиология” представлен ряд экспериментальных статей, посвященных исследованию антимикробных свойств хитозана и его производных, в отношении как грамположительных и грамотрицательных бактерий (Благодатских и соавт., 2018; Гегель и соавт., 2018), так и мицелиальных грибов (Актуганов и соавт., 2018) и родственных грибам микроорганизмов (Салтыкова и соавт., 2018). Эти статьи были подготовлены в рамках проведения 14 международной конференции “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” (РосХит-2018) 17–23 сентября 2018 г. в Севастополе, поддержанной грантом РФФИ № 18-04-20055.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Актуганов Г.Э., Сафина В.Р., Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Бойко Т.Ф., Мелентьев А.И. Устойчивость к хитозану бактерий и микромицетов, различающихся по способности к продукции внеклеточных хитиназ и хитозаназ // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 599–609. Aktuganov, G.E., Safina, V.R., Galimzianova, N.F., Kuz'mina, L.Yu., Gilvanova, E.A., Boyko, T.F., and Melent'ev, A.I. Chitosan resistance of bacteria and micromycetes differing in ability to produce extra-

- cellular chitinases and chitosanases, *Microbiology (Moscow)*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 716–724.
- Благодатских И.В., Вышиванная О.В., Александрова А.В., Безродных Е.А., Зеленыхин П.В., Куликов С.Н., Тихонов В.Е. Антибактериальные свойства и цитотоксичность бетанированных производных олигохитозана // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 5. С. 725–731. Blagodatskikh, I.V., Vyshivannaya, O.V., Alexandrova, A.V., Bezrodnykh, E.A., Zelenikhin, P.V., Kulikov, S.N., and Tikhonov, V.E. Antibacterial activity and cytotoxicity of betainated oligochitosane derivatives, *Microbiology (Moscow)*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 610–617.
- Гегель Н.О., Зудина И.В., Малинкина О.Н., Шиповская А.В. Влияние изомерной формы аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность ее солей с хитозаном // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 5. С. 618–623. Gegel', N.O., Zudina, I.V., Malinkina, O.N., and Shipovskaya, A.V. Effect of ascorbic acid isomeric forms on antibacterial activity of its chitosan salts, *Microbiology (Moscow)*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 732–737.
- Ильина А.В., Варламов В.П. Нейтрализация активных форм кислорода хитозаном и его производными *in vitro/in vivo* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52. № 1. С. 5–20. Il'ina A.V., Varlamov V.P. Neutralization of reactive oxygen species by chitosan and its derivatives *in vitro/in vivo* (review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. P. 1–14.
- Ильина А.В., Варламов В.П. Противоопухолевая активность гетерохитоолигосахаридов в опытах *in vitro* (обзор) // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 1. С. 5–14. Il'ina A.V., Varlamov V.P. In vitro antitumor activity of heterochitoooligosaccharides (review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. P. 1–10.
- Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Куликов С.Н., Варламов В.П. Исследование антимикотической активности *in vitro* металлокомплексов кватернизированного производного хитозана с ионами меди // *Микробиология*. 2017. Т. 86. № 5. С. 586–592. Il'ina A.V., Shagdarova B.T., Lun'kov A.P., Varlamov V.P., Kulikov S.N. In vitro antifungal activity of metal complexes of a quaternized chitosan derivative with copper ions // *Microbiology (Moscow)*. 2017. T. 86. S. 590–595.
- Куликов С.Н., Хайруллин Р.З. Механизм действия и роль химической структуры в антибактериальной и антимикотической активности хитозана // *Хитозан* / Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М.: Изд. Центр “Биоинженерия РАН”, 2013. С. 363–407.
- Мысякина И.С., Бокарева Д.А., Усов А.И., Феофилова Е.П. Различия в составе углеводов дрожжеподобных клеток и мицелия *Mucor hiemalis* // *Микробиология*. 2012. Т. 81. № 4. С. 443–446. Mysyakina I.S., Bokareva D.A., Usov A.I., Feofilova E.P. Differences in the carbohydrate composition between the yeastlike and mycelial cells of *Mucor hiemalis* // *Microbiology (Moscow)*. 2012. V. 81. P. 405–408.
- Немцев С.В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных. М.: Изд-во ВНИРО, 2006. 134 с.
- Немцев С.В., Зуева О.Ю., Хисматуллин М.Р., Албулов А.И., Варламов В.П. Получение хитина и хитозана из медоносных пчел // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2004. Т. 40. № 1. С. 46–50. Nemtsev S.V., Zueva O.Yu., Khismatullin M.R., Albulov A.I., Varlamov V.P. Isolation of chitin and chitosan from honeybees // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2004. V. 40. P. 39–43.
- Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А., Колесников Л.Е., Тюттерев С.Л. Биологическая активность хитозана с разной молекулярной массой // *Вестник защиты растений*. 2017. № 3 (93). С. 28–33.
- Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Каскинова М.Д., Гатауллин А.Р., Матниязов Р.Т., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Действие хитозана на развитие микроспоридий *Nosema apis* в медоносных пчелах // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 5. С. 624–630. Saltykova, E.S., Gaifullina, L.R., Kaskinova, M.D., Gataullin, A.R., Matniyazov, R.T., Poskryakov, A.V., and Nikolenko, A.G. Effect of chitosan on development of *Nosema apis* microsporidia in honey bees, *Microbiology (Moscow)*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 738–743.
- Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П., Немцев Д.В., Козлов В.М. Получение из мицелиальных грибов полисахаридных комплексов и определение степени их деацетиляции // *Микробиология*. 1997. Т. 66. № 1. С. 70–75. Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Feofilova E.P. Nemtsev D.V., Kozlov V.M. Isolation of polysaccharide complexes from mycelial fungi and determination of their deacetylation degree // *Microbiology (Moscow)*. 1997. V. 66. P. 84–89.
- Феофилова Е.П. Ключевая роль хитина в образовании клеточной стенки грибов // *Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение* / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. М.: Наука, 2002а. С. 79–100.
- Феофилова Е.П. Хитин грибов: распространение, биосинтез, физико-химические свойства и перспективы использования // *Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение* / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. М.: Наука, 2002б. С. 101–111.
- Хитозан. Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М.: Изд. Центр “Биоинженерия РАН”, 2013. 593 с.
- Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Лопатин С.А., Карпашов М.И., Арсланова Л.Р., Джавахия В.Г., Варламов В.П. Изучение защитного действия гидролизата хитозана против септориоза пшеницы и альтернариоза табака // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 1. С. 68–73. Shagdarova B.Ts., Il'ina A.V., Lopatin S.A., Kartashov M.I., Arslanova L.R., Dzhevakhia V.G., Varlamov V.P. Study of the protective activity of chitosan hydrolyzate against septoria leaf blotch of wheat and brown spot of tobacco // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. P. 68–73.
- Blagodatskikh I.V., Kulikov S.N., Vyshivannaya O.V., Bezrodnykh E.A., Tikhonov V.E. N-Reacetylated oligochitosan: pH dependence of self-assembly properties and antibacterial activity // *Biomacromolecules*. 2017. V. 18. P. 1491–1498. doi 10.1021/acs.biomac.7b00039
- Chang S.H., Lin H.T., Wu G.J., Tsai G.J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan // *Carbohydr. Polym.* 2015. V. 134. P. 74–81. doi 10.1016/j.carbpol.2015.07.072
- Dragland I.S., Rukke H.V., Stenhagen I.S., Lönn-Stensrud J., Kopperud H.M. Antibacterial and antibiofilm effect of low viscosity chitosan against *Staphylococcus epidermidis* // *Int. J. Microbiol.* 2016. Article ID 9159761. doi 10.1155/2016/9159761

- Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications // Food Chem. 2009. V. 114. P. 1173–1182. doi 10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- Glinel K., Thebault P., Humblot V., Pradier C.M., Jouenne T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches // Acta Biomater. 2012. V. 8. P. 1670–1684. doi 10.1016/j.actbio.2012.01.011
- Goy R.C., de Britto D., Assis O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan // Polimeros. 2009. V. 19. P. 241–247. http://dx.doi.org/ doi 10.1590/S0104-14282009000300013
- Junter G.A., Thébault P., Lebrun L. Polysaccharide-based antibiofilm surfaces // Acta Biomater. 2016. V. 30. P. 13–25. doi 10.1016/j.actbio.2015.11.010
- Karimi K., Zamani A. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 466–481.
- Kulikov S.N., Lisovskaya S.A., Zelenikhin P.V., Bezrodnykh E.A., Shakirova D.R., Blagodatskikh I.V., Tikhonov V.E. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight-activity relationship // Eur. J. Med. Chem. 2014. V. 74. P. 169–178. doi 10.1016/j.ejmech.2013.12.017
- Kumar M.R., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa, H., Domb A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives // Chem. Revs. 2004. V. 104. P. 6017–6084.
- Kuprina E., Kirillov A.I., Ishevski A.L., Murashev S.V. Food supplement based on chitin with enhanced lipid-lowering and sorption properties // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives. 2015. V. XX. P. 156–161.
- Li J., Wu Y., Zhao L. Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight // Carbohydr. Polym. 2016. V. 148. P. 200–205. doi 10.1016/j.carbpol.2016.04.025
- Mellegård H., Strand S.P., Christensen B.E., Granum P.E., Hardy S.P. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 148. P. 48–54. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.023
- Muzzarelli R.A.A., Boudrant J., Meyer D., Manno N., DeMarchis M., Paoletti M.G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial // Carbohydr. Polym. 2012. V. 87. P. 995–1012.
- Oliveira W.F., Silva P.M.S., Silva R.C.S., Silva G.M.M., Machado G., Coelho L.C.B.B., Correia M.T.S. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants // J. Hosp. Infect. 2018. V. 98. P. 111–117. doi 10.1016/j.jhin.2017.11.008
- Paolicelli P., de la Fuente M., Sánchez A., Seijo B., Alonso M.J. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye // Expert Opin. Drug Deliv. 2009. V. 6. P. 239–253.
- Roberts G.A. Thirty years of progress in chitin and chitosan // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. 2008. V. XIII. P. 7–15.
- Rouget C. Des Substances Amylacees dans le Tissu des Animaux, Specialement les Articules (Chitine). Compt. Rend. 1859. V. 48. P. 792–795.
- Sankov V., Shagdarova B., Varlamov V., Esipov R., Svirshchevskaya E. Large size DNA *in vitro* and *in vivo* delivery using chitosan transfection // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives. 2017. V. XXII. P. 190–200.
- Silva L.P., Britto D., Selegim M.H.R., Assis O.B.G. *In vitro* activity of water-soluble quaternary chitosan chloride salt against *E. coli* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 2089–2092.
- Tsigos I., Zydowicz N., Martinou A., Domard A., Bouriotis V. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans // Eur. J. Biochem. 1999. V. 261. P. 698–705.
- Vasilev K., Cook J., Griesser H.J. Antibacterial surfaces for biomedical devices // Expert Rev. Med. Devices. 2009. V. 6. P. 553–567. doi 10.1586/erd.09.36
- Xia W., Liu P., Zhang J., Chen J. Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides // Food Hydrocolloids. 2011. V. 25. P. 170–179.
- Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // Mur. Drugs. 2015. V. 13. P. 1133–1174.
- Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities // Int. J. Food Microbiol. 2014. V. 185. P. 57–63. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029
- Zubareva A., Shagdarova B., Varlamov V., Kashirina E., Svirshchevskaya E. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives // Eur. Polymer J. 2017. V. 93. P. 743–749.
- Zubareva A.A., Shcherbinina T.S., Varlamov V.P., Svirshchevskaya E.V. Intracellular sorting of differently charged chitosan derivatives and chitosan-based nanoparticles // Nanoscale. 2015. V. 7. P. 7942–7962. doi 10.1039/c5nr00327

Chitosan in Biology, Microbiology, Medicine, and Agriculture

V. P. Varlamov^{1,*} and I. S. Mysyakina²

¹Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Received April 20, 2018

Abstract—The mini-review deals with the recent developments in investigation and application of chitosan and its derivatives within a broad range of human activities. A short historical note on discovery of chitin and chitosan is provided. Special attention is paid to chitosan occurrence and structure, as well as to antimicrobial properties of this biopolymer and their dependence upon the physicochemical characteristics of chitosan: its molecular mass and deacetylation degree, and the conditions of derivative formation. The possible mechanisms of chitosan biological activity are briefly considered.

Keywords: chitin, chitosan, chitosan derivatives, antimicrobial activity

УСТОЙЧИВОСТЬ К ХИТОЗАНУ БАКТЕРИЙ И МИКРОМИЦЕТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СПОСОБНОСТИ К ПРОДУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ХИТИНАЗ И ХИТОЗАНАЗ

© 2018 г. Г. Э. Актуганов^а, *, В. Р. Сафина^а, Н. Ф. Галимзянова^а, Л. Ю. Кузьмина^а,
Е. А. Гильванова^а, Т. Ф. Бойко^а, А. И. Мелентьев

^аУфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Поступила в редакцию 30.01.2018 г.

Исследовано влияние хитозана на рост и развитие штаммов бактерий и микромицетов, различающихся по способности к синтезу хитиназ и хитозаназ. Установлено, что штаммы бактерий, одновременно продуцирующие хитиназы и хитозаназы, демонстрируют более высокую устойчивость к растворимому хитозану по сравнению с культурами, синтезирующими только хитиназы, и неактивными штаммами. Наибольшую устойчивость проявлял штамм *Paenibacillus ehimensis* IB-739 (минимальная бактерицидная концентрация хитозана 14–15 мг/мл), характеризующийся индуцибельным синтезом хитиназ и хитозаназ. Не обнаружено прямой взаимосвязи между уровнем продукции хитозаназ бактериями и их устойчивостью к хитозану. В сублетальных концентрациях хитозан активировал рост некоторых штаммов; наиболее интенсивный рост хитозан-деградирующих бактерий совпадал с максимальными значениями их хитозаназной активности. Не обнаружено подавляющего действия хитозана в исследуемом диапазоне концентраций (≤ 16 мг/мл) на штамм гриба *Penicillium* sp. IB-37-2A – продуцента экзо-1,4- β -глюкозаминидазы. В отличие от неактивных культур микромицетов, рост этого гриба значительно активировался в присутствии хитозана; максимальная концентрация полисахарида способствовала 6-кратному увеличению выхода биомассы *Penicillium* sp. IB-37-2A.

Ключевые слова: хитозан, хитозаназ, хитиназа, бактерии, микромицеты, антимикробная активность, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Penicillium*

DOI: 10.1134/S0026365618050026

Хитозан – аминополисахарид, достаточно редко встречающийся в живой природе. Он обнаружен в качестве структурного полисахарида у ограниченного круга организмов, таких как мукоровые грибы и зеленые водоросли рода *Chlorella* (Karaun, Reisser, 1995; Takeda, 1995; Raafat, Sahl, 2009). Кроме того, хитозан-содержащие фрагменты могут выявляться в структуре хитиновых фибрилл у насекомых (Raafat, Sahl, 2009; Zhao et al., 2010). В естественных условиях хитозан образуется в результате ферментативного деацетилирования вновь синтезированного хитина под действием хитиндеацетилаз (КФ 3.2.1.41) до начала его “кристаллизации”. В настоящее время, благодаря наличию ряда уникальных свойств, этот аминополисахарид нашел широкое применение в сельском хозяйстве, пищевой, текстильной индустрии и других областях (Younes, Rinaudo, 2015; Cheung, 2015). Ввиду ограниченности природных источников хитозана его получают в

промышленных масштабах путем щелочного деацетилирования хитина.

Хитозан и его производные обладают разносторонней биологической активностью, при этом одной из первых у него была обнаружена способность эффективно подавлять рост грамотрицательных и грамположительных бактерий, а при определенных условиях и разрушать их клетки (Liu et al., 2004; Aam et al., 2010; Xia et al., 2011). Ингибируя размножение вирусов, а также рост бактерий, мицелиальных и дрожжеподобных грибов, хитозан оказывает меньшее влияние на клетки млекопитающих, что предопределило и его использование, в том числе и в медицине (Younes, Rinaudo, 2015; Cheung, 2015). Антимикробная активность высокомолекулярного хитозана и его олигомеров, по-видимому, является результатом их взаимодействия с клеточной стенкой и липидами ЦПМ бактерий и грибов (Куликов и

соавт., 2009; Helander et al., 2001; Liu et al., 2004; Fernandes et al., 2009; Tao et al., 2011).

Степень полимеризации и степень деацетилирования хитозана и его олигомеров имеют существенное значение для проявления их антигрибной активности (Куликов и соавт., 2009; Aam et al., 2010). По-видимому, чувствительность микромицетов к хитозану во многом определяется также составом их ЦПМ (Palma-Guerrero et al., 2010). Установлено, что антигрибная активность против *Fusarium oxysporum* начинает проявляться у тримеров и далее резко возрастает у гекса- и гептамеров, а также более высокомолекулярных фракций хитозана (Kendra, Hadwiger, 1984). Аналогичные результаты были получены при действии на *Escherichia coli* и другие бактерии (Tokura et al., 1997). В ряду исследованных хитоолигомеров с молекулярной массой (М.м.) 1, 3 и 5 кДа и низкомолекулярного хитозана с М.м. 10 кДа при их тестировании против шести видов фитопатогенных и плесневых грибов, олигомеры с более высокой степенью полимеризации демонстрировали более сильный ингибирующий эффект, при этом максимальная активность отмечалась у низкомолекулярного хитозана с М.м. 10 кДа (Park et al., 2008). Предполагается, что хитозан-деградирующие микроорганизмы могут проявлять устойчивость к хитозану за счет его глубокого расщепления до неактивных или менее активных фрагментов – мономера, димера и т.д. (Viens et al., 2015). Это предположение было подкреплено данными по сравнительной устойчивости некоторых естественных и рекомбинантных штаммов бактерий – продуцентов хитозаназа (Ghinet et al., 2010; Viens et al., 2015). С другой стороны, установлено, что рост некоторых бактериальных продуцентов хитозаназа в процессе их культивирования в присутствии коллоидного хитозана может затем резко ингибироваться под влиянием образуемых водорастворимых продуктов частичного расщепления этого субстрата (Brzezinski, 2011). Известно, что микробные хитиназы способны гидролизовать частично N-ацетилированный хитозан (Puina et al., 2000; Aam et al., 2010), в связи с чем хитинолитические бактерии также можно рассматривать как потенциально устойчивые к действию хитозана. Кроме того, остается слабоизученной роль хитозаназа микромицетов в их резистентности к данному биополимеру.

Цель настоящей работы состояла в оценке устойчивости к хитозану штаммов бактерий и микромицетов, различающихся по способности к синтезу внеклеточных хитиназ и хитозаназ и возможной протекторной функции этих ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследований являлись штаммы бактерий и микромицетов из коллекции Уфимского Института биологии РАН и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ РАН), проявляющие различную способность к гидролизу хитина и хитозана. В качестве тест-культур, неспособных гидролизовать хитин и хитозан, использовали штаммы *Bacillus subtilis* IB-54 (депонирован в коллекции ВКПМ под номером В-9795) и *Escherichia coli* XL1-Blue (коммерческий лабораторный штамм, любезно предоставленный Институтом биохимии и генетики УНЦ РАН). В качестве слабоактивных в отношении гидролиза хитозана были взяты штаммы бактерий *B. atrophaeus* IB-33-1 и *B. licheniformis* IB-A41.4.2, не продуцирующие хитозаназу (последовательность гена 16S рРНК штамма *B. licheniformis* IB-A41.4.2 депонирована в GenBank NCBI под номером HE995758.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HE995758.1>). Наконец, влияние хитозана изучали также в отношении бактериальных культур, способных к одновременной продукции хитиназ и хитозаназ, включая штаммы *B. cereus* ВКМ В-688, *B. thuringiensis* ВКМ В-387 и *Paenibacillus ehimensis* IB-739 (депонирован в ВКМ под номером В-2680D).

В качестве тест-культур микромицетов использовали хитозан-деградирующий штамм *Penicillium* sp. IB-37-2A (ВКМ F-4780), неактивный в отношении деструкции хитина и хитозана штамм *P. funiculosum* IB Г-30 и фитопатогенные грибы *Bipolaris sorokiniana* IB Г-12 и *Fusarium culmorum* ВКМ F-844.

Штаммы бактерий поддерживали при 37°C на агаризованной среде LB (*E. coli*, *B. cereus* В-688, *B. thuringiensis* В-387), картофельном агаре (*B. subtilis* IB-54) и среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; CaCl_2 – 0.1; пептон ферментативный – 3.0; дрожжевой экстракт – 3.0; кукурузный экстракт – 1.0; коллоидный хитин – 5.0; агар – 16.0, pH среды 6.0–6.5. Микромицеты поддерживали при 28°C пересевами на картофельно-глюкозном агаре (КГА).

В работе использовали коммерческий хитозан с М.м. 200–230 кДа и степенью деацетилирования около 85%, согласно данным производителя (“ЗАО Биопрогресс”, Россия). Коллоидный хитин готовили из крабового хитина (“ЗАО Биопрогресс”, Россия) как описано ранее (Актуганов с соавт., 2016).

Для оценки антимикробного действия хитозана его предварительно растворяли в 0.2 М соляной кислоте до концентрации 1–4 мас. % Полученный раствор титровали 0.2 М NaOH до pH 5.5–5.8 и вносили в различных объемах в жидкую среду LB до конечных концентраций от 0.25 до 10 мг/мл и более. Бактерии вносили в среду в

виде инокулята 18–20-часовой пред-культуры, культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на шейкере-инкубаторе Innova 40R при 200 об./мин и 36°C в течение 4–5 сут. Бактериальный рост оценивали по оптической плотности культур при 630 нм, а также по их титру, определяемому методом серийных разведений. В качестве минимальной ингибирующей концентрации принимали количества хитозана в среде, вызывающие задержку или заметное подавление развития бактерий без потери жизнеспособности клеток. Концентрации хитозана, вызывающие гибель от 99 до 99.9% и более клеток, считали бактерицидными.

При оценке действия хитозана на рост микромицетов его вносили в жидкую среду Чапека с 3% сахарозы. Микромицеты инкубировали в течение 9 сут при 28°C в статических условиях. Образовавшийся мицелий собирали на воронке Бюхнера под вакуумом, промывали от остатков среды и высушивали при 105°C до постоянного веса. Относительный выход биомассы оценивали по сравнению с контрольной средой, не содержащей хитозана. Кроме того, проводили сравнительную оценку влияния хитозана на рост грибов рода *Penicillium* и продукцию ими хитозаназы при глубинном культивировании в условиях активной аэрации. Для этого хитозан вносили в различных концентрациях в жидкую среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1.0; NaNO_3 – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; CaCl_2 – 0.1; пептон ферментативный – 2.0; дрожжевой экстракт – 3.0; кукурузный экстракт – 2.0. Микромицеты выращивали на шейкере-инкубаторе при 160 об./мин и 28°C в течение 7 сут.

Хитозаназную и хитиназную активности в культуральной среде бактериальных и грибных штаммов определяли методами, описанными в работе Актуганова и соавт. (2016).

Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку осуществляли с помощью программы ORIGIN SRO 7.0 (версия 7.0220 (B220), “OriginLab Corp.”). Достоверными считали различия между сравниваемыми выборками при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было изучено антимикробное действие высокомолекулярного (≥ 200 кДа) хитозана в отношении штаммов, проявляющих различную способность к продукции внеклеточных хитиназ и хитозаназ. Штаммы *E. coli* XL1-Blue и *B. subtilis* IB-54 не деградировали хитин и хитозан, а также не росли на средах, содержащих эти полисахариды в качестве единственного источника углерода и азота. Все остальные штаммы характеризовались хорошей хитинолитической активностью, при этом только три штамма демонстрировали

способность к одновременной деструкции хитина и хитозана. Штаммы, продуцирующие хитиназы и хитозаназы, формировали крупные прозрачные ореолы гидролитического расщепления хитозана в агаре по сравнению с культурами, синтезирующими только хитиназы (рис. 1). Тем не менее, все хитинолитические культуры при выращивании в жидкой среде с коллоидным хитином продуцировали ферменты, способные разрушать как хитин, так и хитозан (данные не представлены). Хитозан-деградирующая активность штаммов, не синтезирующих хитозаназу (*B. atrophaeus* IB-33-1, *B. licheniformis* IB-A41.4.2), может быть объяснена неспецифическим действием их хитиназ на этот субстрат. Наиболее высокая продукция хитиназ и хитозаназ в присутствии коллоидного хитина регистрировалась у штамма *B. thuringiensis* ВКМ В-387. Кроме того, этот штамм, как и *B. cereus* В-688, показывали способность к конститутивному синтезу хитозаназ. Оценка влияния различных концентраций хитозана в среде LB на рост и динамику развития бактерий подтвердила зависимость степени устойчивости исследуемых штаммов от их способности к синтезу хитозаназ и уровня хитозан-деградирующей активности (рис. 2). Наибольшую чувствительность к хитозану в первые сутки культивирования показывали неактивные штаммы, в особенности, *B. subtilis* IB-54, а также хитинолитические культуры бацилл, не продуцирующие хитозаназ. Отсутствие видимого развития этих штаммов на данном этапе (24 ч) отмечалось уже при концентрациях хитозана 0.25–0.50 мг/мл (рис. 2а). Напротив, штаммы, способные к одновременной продукции хитиназ и хитозаназ, были чувствительны к более высоким концентрациям полимера, от 1.5 до 4 мг/мл. При этом штамм *P. ehimensis* IB-739, характеризующийся индуцибельным синтезом хитозаназ, проявлял большую устойчивость, по сравнению с культурами, продуцирующими эти ферменты конститутивно (рис. 2б). Следует отметить, что пороговые ингибирующие концентрации хитозана в большинстве случаев приводили к подавлению роста бактерий только на первые сутки культивирования, вызывая, в основном, задержку их развития на 24–72 ч. На примере штамма *P. ehimensis* IB-739 видно, что концентрация хитозана 2 мг/мл приводила к задержке роста бактерий на 24 ч, при концентрации 4 мг/мл максимум роста смещался на 3 сут, по сравнению с контролем, и лишь концентрация 10 мг/мл приводила к необратимому ингибированию дальнейшего развития (рис. 3а). Похожий отклик давали все тестированные культуры бацилл, в том числе неактивный штамм *B. subtilis* IB-54 при концентрациях 0.25–0.50 мг/мл. Отмеченный феномен не обнаруживался только у штамма *E. coli* XL1-Blue.

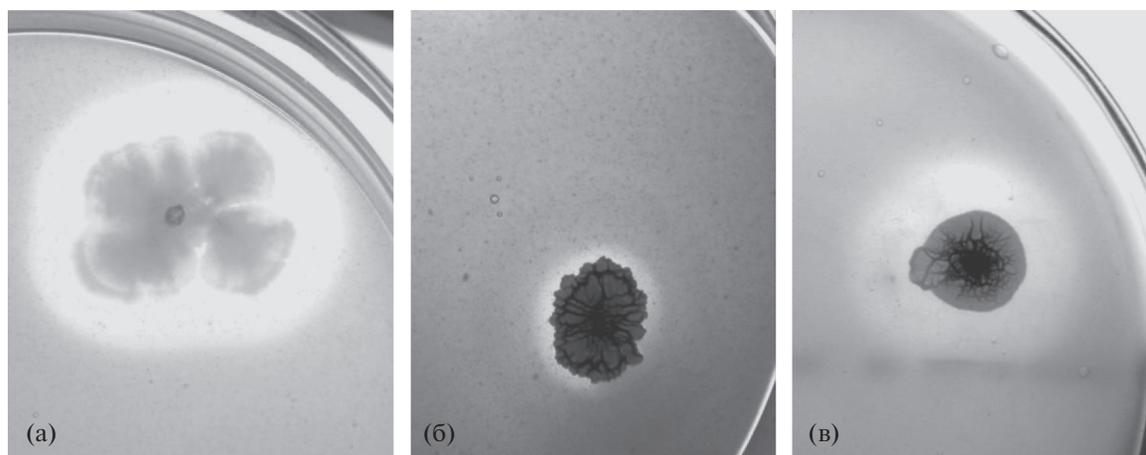


Рис. 1. Формирование различных типов зон гидролиза хитозана в агаризованной среде штаммами *P. ehimensis* IB-739 (а), *B. atrophaeus* IB-33-1 (б) и *B. licheniformis* IB-41.4.2 (в). 4–5-е сут культивирования, 37°C, среда с 0.4 мас. % хитозана.

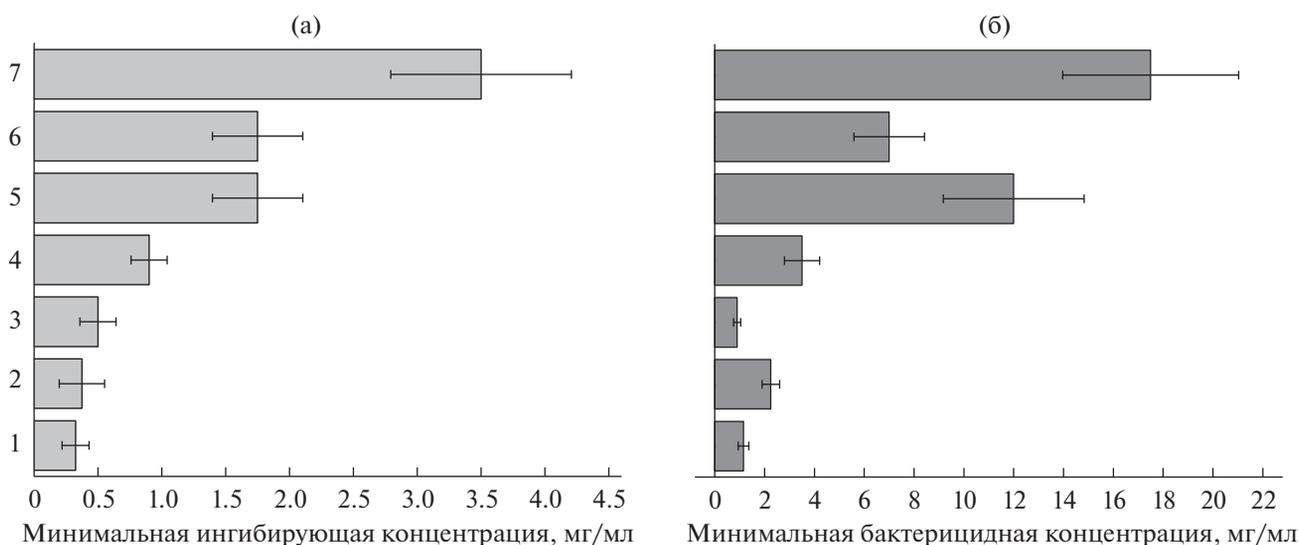


Рис. 2. Минимальная ингибирующая (а) и минимальная бактерицидная (б) концентрации высокомолекулярного хитозана в среде LB в отношении штаммов бактерий, проявляющих различную способность к продукции хитино- и хитозанолизитических ферментов. 1 – *B. subtilis* IB-54; 2 – *B. licheniformis* IB-A41.4.2; 3 – *B. atrophaeus* IB-33-1; 4 – *E. coli* XLI Blue; 5 – *B. cereus* ВКМ В-688; 6 – *B. thuringiensis* ВКМ В-387; 7 – *P. ehimensis* IB-739.

На определенных стадиях культивирования в присутствии хитозана у некоторых штаммов наблюдалась активация роста. Так у штамма *P. ehimensis* IB-739 происходило увеличение оптической плотности культуры на 53%, по сравнению с максимальным значением в контроле после 96 ч культивирования при концентрации хитозана 4 мг/мл (рис. 3а), у *B. subtilis* IB-54 – на 23% после 72 ч при 0.25 мг/мл, у *B. atrophaeus* IB-33-1 – на 44% после 72 ч при 0.40 мг/мл. Однако при этом у штаммов *P. ehimensis* IB-739 и *B. subtilis* IB-54 не отмечалось достоверного увеличения титра клеток по сравнению с контролем (табл. 1). Данный

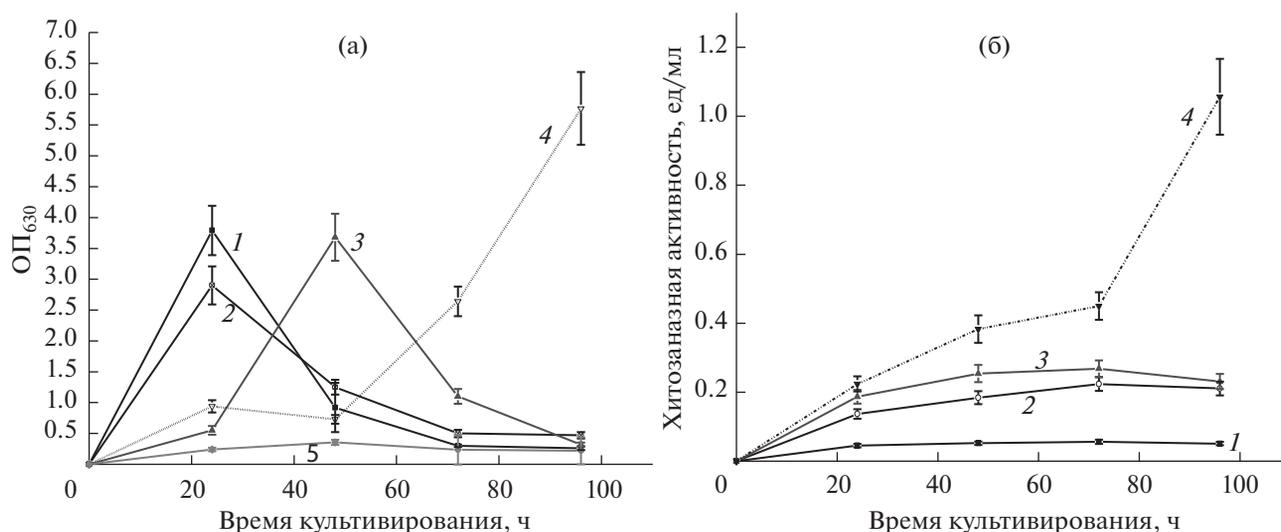
факт показывает, что увеличение оптической плотности культуры могло происходить за счет повышенной синтеза данными культурами внеклеточных высокомолекулярных соединений, например, экзополисахаридов (ЭПС), как вероятного защитного отклика на присутствие хитозана. Функция защитного барьера, в том числе, против антимикробных агентов, токсических соединений и т.п. хорошо известна для бактериальных ЭПС, хотя достоверных сведений об индукции синтеза ЭПС в присутствии хитозана пока отмечено не было. Высокие концентрации хитозана, необратимо ингибируя рост штамма *P. ehimensis* IB-739,

Таблица 1. Развитие штаммов бактерий, различающихся по способности к продукции хитозаназы, при глубинном культивировании в присутствии различных концентраций хитозана (СД ~ 85%)

Хитозан, мг/мл среды LB	Титр бактерий, КОЕ/мл				
	<i>P. ehimensis</i> IB-739, 96 ч	<i>E. coli</i> XL1-Blue, 96 ч	<i>B. subtilis</i> IB-54, 72 ч	<i>B. thuringiensis</i> ВКМ В-387, 24 ч	<i>B. athrophaeus</i> IB-33-1, 24 ч
Контроль (без хитозана)	$2.08 \pm 0.18 \times 10^6$	$4.70 \pm 0.41 \times 10^6$	$0.41 \pm 0.07 \times 10^9$	$3.33 \pm 0.66 \times 10^8$	$2.53 \pm 0.24 \times 10^8$
0.25	НД*	НД	$0.99 \pm 0.27 \times 10^9$	НД	НД
0.40	НД	НД	НД	$3.05 \pm 0.50 \times 10^8$	$0.65 \pm 0.13 \times 10^6$
0.50	НД	НД	$1.09 \pm 0.13 \times 10^9$	НД	НД
0.80	НД	НД	НД	$4.70 \pm 1.90 \times 10^7$	$0.15 \pm 0.06 \times 10^5$
1.0	$1.97 \pm 0.47 \times 10^6$	$0.87 \pm 0.19 \times 10^5$	$2.28 \pm 0.32 \times 10^5$	НД	НД
1.6	НД	НД	НД	$0.33 \pm 0.03 \times 10^6$	$0.30 \pm 0.01 \times 10^4$
2.0	$2.08 \pm 0.74 \times 10^6$	$<10^5$	$0.67 \pm 0.07 \times 10^5$	НД	НД
3.2	НД	НД	НД	0	0
4.0	$3.4 \pm 0.28 \times 10^6$	$<10^3$	$0.62 \pm 0.07 \times 10^5$	НД	НД
6.4	НД	НД	НД	0	0
8.0	НД	НД	$0.95 \pm 0.21 \times 10^4$	—**	—
10.0	$2.83 \pm 0.25 \times 10^6$	0	$<10^3$	—	—
20.0	$0.77 \pm 0.12 \times 10^6$	0	0	—	—
30.0	$1.47 \pm 0.27 \times 10^6$	0	0	—	—

* НД — нет данных.

**(-) — результаты не учитывались по причине низких бактерицидных концентраций.

**Рис. 3.** Динамика роста (а) и продукции хитозаназы (б) штаммом *P. ehimensis* IB-739 при глубинном культивировании в присутствии различных концентраций хитозана. 1 — контроль (без хитозана); 2 — 1 мг/мл; 3 — 2 мг/мл; 4 — 4 мг/мл; 5 — 10 мг/мл.

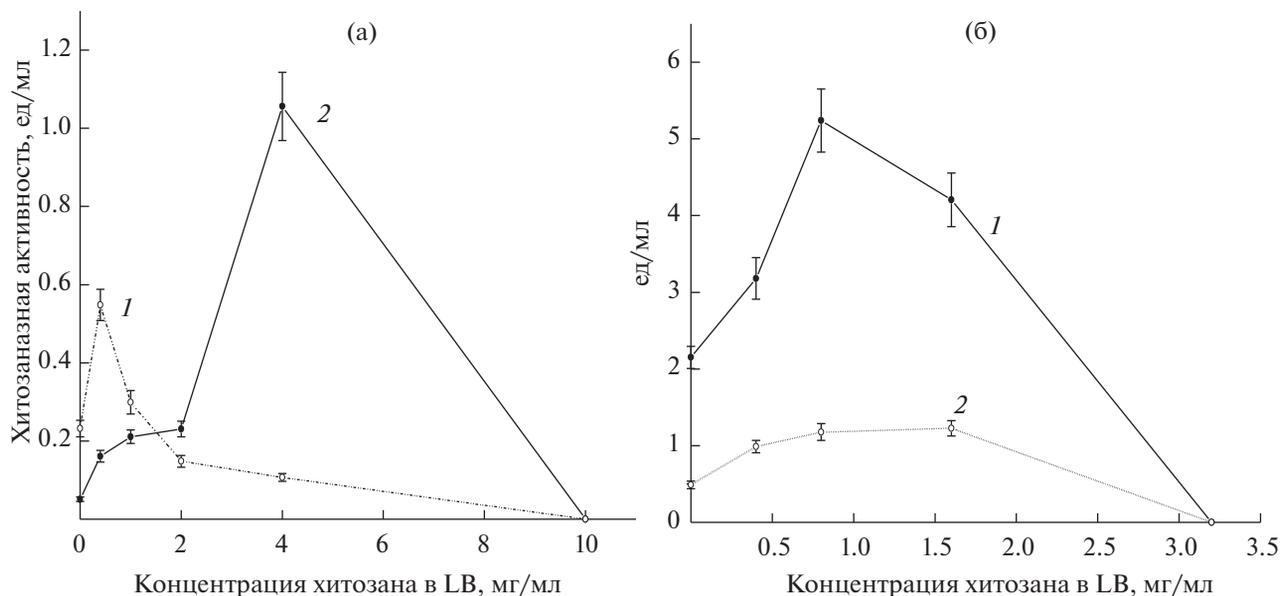


Рис. 4. Влияние концентрации хитозана на синтез хитинолитических ферментов хитозан-деградирующими штаммами бактерий: а – синтез хитозаназы штаммами *B. cereus* ВКМ В-688 (1) и *P. ehimensis* IB-739 (2); б – синтез хитозаназы (1) и хитиназы (2) штаммом *B. thuringiensis* ВКМ В-387.

тем не менее, не вызывали полной гибели его клеток. Так, концентрации 20–30 мг/мл приводили к снижению титра примерно в 20–40 раз по сравнению с контролем. В то же время, титр штамма *E. coli* XL1-Blue падал в 10^4 – 10^5 раз при концентрации хитозана 2–4 мг/мл, титр *B. subtilis* IB-54 и *B. atrophaeus* IB-33-1 – в 10^3 – 10^4 раз при 1–2 мг/мл. Несмотря на высокую хитозаназную активность штамма

B. thuringiensis ВКМ В-387, полная гибель его клеток наблюдалась при концентрациях хитозана 3–6 мг/мл. Штамм *B. cereus* В-688 демонстрировал критическое снижение титра (в 10^3 – 10^4 раз) при 10 мг/мл, будучи устойчив к концентрациям до 5 мг/мл (табл. 1).

У штаммов, продуцирующих хитозаназы, наблюдалась корреляция между динамикой роста и синтеза данных ферментов при различных кон-

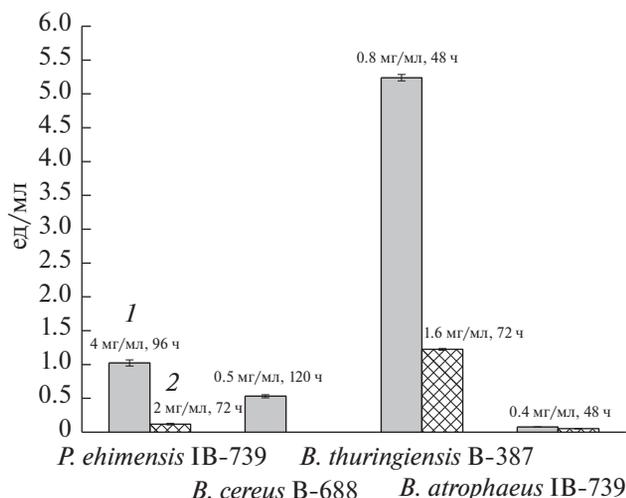


Рис. 5. Максимальный уровень синтеза хитозаназы (1) и хитиназы (2) активными штаммами бактерий в присутствии хитозана в среде LB. Для каждого штамма показано значение концентрации хитозана и время культивирования, при которых регистрировался наибольший уровень продукции ферментов.

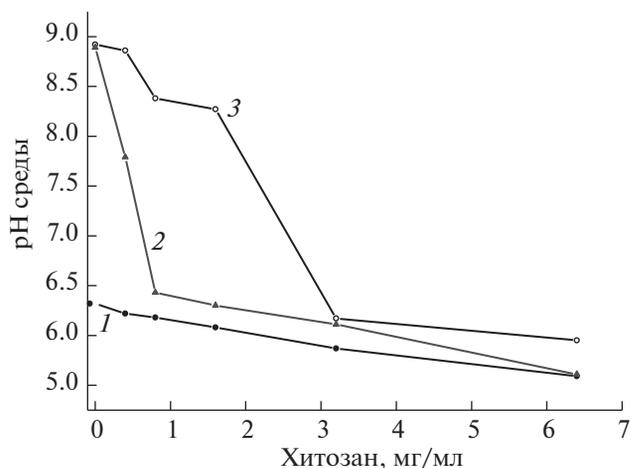


Рис. 6. Конечное значение рН в культуральной среде бактериальных штаммов, развивающихся в присутствии различных концентраций хитозана (48 ч культивирования): 1 – контроль (стерильная среда); 2 – *B. atrophaeus* IB-33-1; 3 – *B. thuringiensis* ВКМ В-387.

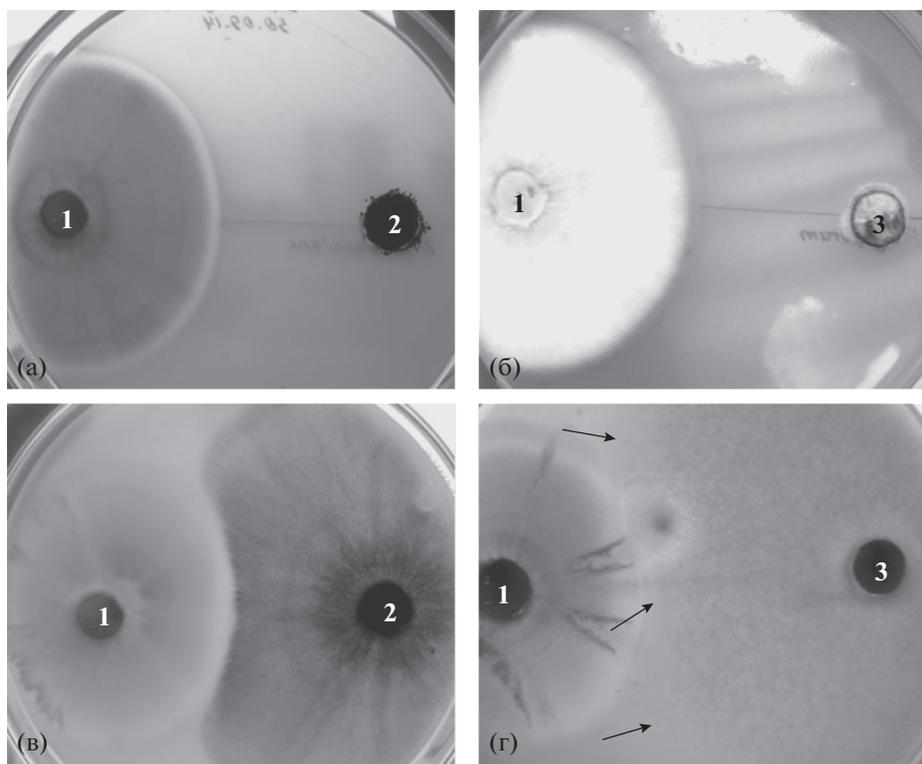


Рис. 7. Развитие хитозан-деградирующего штамма *Penicillium* sp. 37-2A (1) и неактивных грибов *Bipolaris sorokiniana* IB Г-12 (2) и *Fusarium culmorum* ВКМ В-844 (3) на средах с 1% растворимого хитозана при pH 5.0–5.5 (а, б) и 1% коллоидного хитина при pH 5.5–6.0 (в, г). Стрелками на рис. 7г показаны границы роста мицелия *F. culmorum* ВКМ В-844.

центрациях хитозана (рис. 3б). При необратимом подавлении развития бактерий (3.2–10 мг/мл) синтез хитозана полностью прекращался (рис. 4а, 4б). Как видно на рис. 4, максимальная секреция хитозаназы у активных культур достигалась в присутствии различных концентраций хитозана, при этом сравнительная устойчивость штаммов напрямую не зависела от уровня их ферментативной активности. Так, штамм *B. thuringiensis* ВКМ В-387, показывающий наиболее высокую продуктивность по хитиназе и хитозаназе (рис. 5), тем не менее, был менее устойчив к действию хитозана по сравнению со штаммами *P. ehimensis* IB-739 и *B. cereus* В-688. За исключением *B. thuringiensis* ВКМ В-387, у активных штаммов не наблюдалось значительной индукции хитиназной активности в присутствии хитозана (рис. 5).

Как известно, pH среды в значительной степени влияет на антибактериальные свойства хитозана, определяя характер взаимодействия протонированной аминогрупп полимера с отрицательно заряженной поверхностью бактериальных клеток (Gil et al., 2004). При пониженных значениях pH (4.5–5.9) бактерицидная активность хитозана проявляется в максимальной степени, поскольку в этих условиях увеличивается как степень протонирования

самого хитозана, так и ионизация карбоксильных и фосфатных групп поверхности бактериальных клеток (Savard et al., 2002). В наших экспериментах начальное значение pH среды снижалось от 6.3–6.4 до 5.5–5.6 при увеличении концентрации хитозана от 0 до 6–10 мг/мл, поскольку хитозан вносили в среду в виде раствора с pH ~ 5.4–5.5 (рис. 6). В интервале активного роста большинства штаммов наблюдалось существенное защелачивание среды до pH 8.5–9.0, в зависимости от штамма (рис. 6). Способность бактерий смещать конечное значение pH в щелочную область при различных концентрациях полимера была различной и во многом согласовывалась с их относительной устойчивостью к хитозану. При концентрациях хитозана, близких к бактерицидным, когда рост бактерий практически подавлялся, значение pH среды оставалось стабильным или близким к начальному (рис. 6).

Полученные результаты показывают, что хитозан-деградирующие бактерии могут различаться по чувствительности к растворимому хитозану, при этом уровень продукции хитозаназы не является определяющим фактором их устойчивости. С другой стороны, высокая хитозаназная активность и интенсивный рост некоторых штаммов

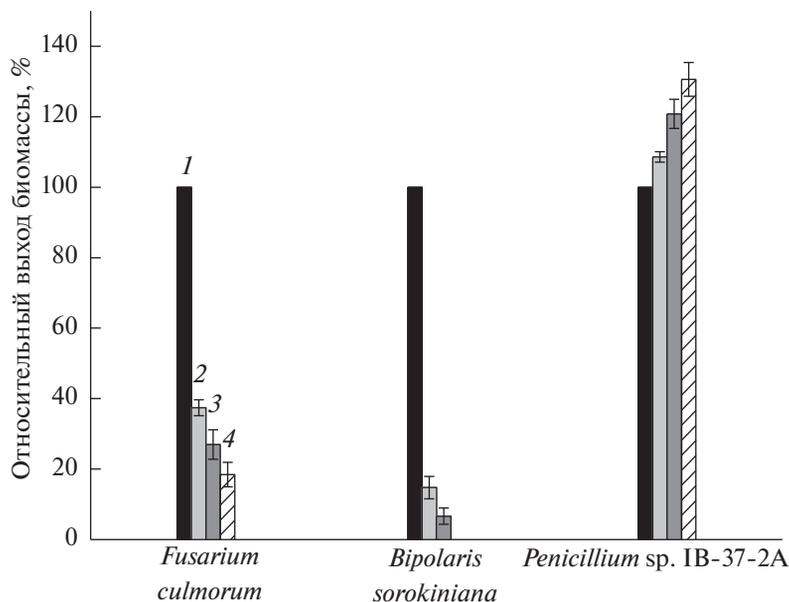


Рис. 8. Влияние различных концентраций хитозана в среде Чапека (3% сахарозы) на относительный выход сухой биомассы фитопатогенных грибов и хитозан-деградирующего штамма *Penicillium sp. IB-37-2A* при статическом культивировании (9 сут, 28°C). 1 – контроль (без хитозана); 2 – 0.8 мг/мл; 3 – 1.6 мг/мл; 4 – 4 мг/мл.

при концентрации растворимого хитозана от 1 до 4 мг/мл показывают их устойчивость, как к самому полимеру, так и растворимым продуктам его ферментативного гидролиза, в отличие от некоторых рекомбинантных бактерий – продуцентов хитозаназ, культивируемых в присутствии коллоидного хитозана (Brzezinski, 2011).

Кроме бактериальных штаммов, нами было испытано несколько грибных культур, различающихся по способности к синтезу хитозаназ. Ак-

тивный штамм, *Penicillium sp. IB-37-2A* – продуцент экзо- β -1,4-глюкозаминидазы (Актуганов и соавт., 2016), имел очевидное преимущество при развитии на агаризованной среде с хитозаном по сравнению с не растущими в этих условиях контрольными штаммами микромицетов (рис. 7а,7б). Напротив, в среде с коллоидным хитином неактивные по хитозаназе грибы развивались даже быстрее (рис. 7в, 7г). Следует отметить, что штамм *Penicillium sp. IB-37-2A* был выделен ранее как специа-

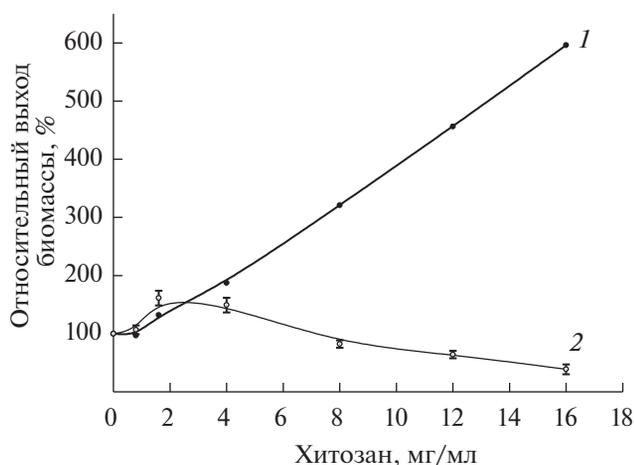


Рис. 9. Влияние концентрации хитозана в жидкой среде на накопление биомассы штамма *Penicillium sp. IB-37-2A* – продуцента хитозаназы (I) и неактивного штамма *P. funiculosum* IB Г-30 (II) после 7 сут глубинного культивирования (160 об./мин, 28°C).

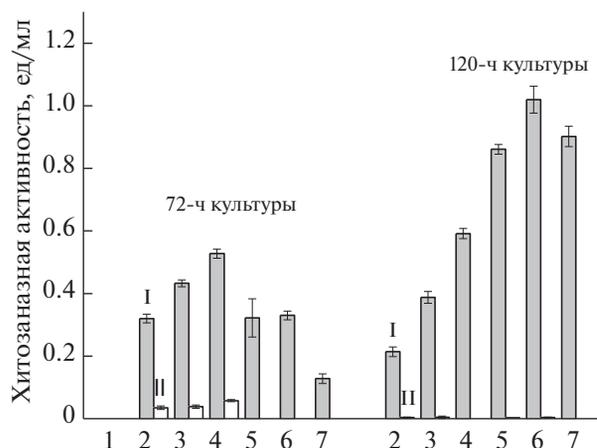


Рис. 10. Влияние концентрации хитозана в жидкой среде на продукцию хитозаназы штаммами *Penicillium sp. IB-37-2A* (I) и *P. funiculosum* IB Г-30 (II) после 72 ч и 120 ч глубинного культивирования (160 об./мин, 28°C). 1 – контроль; 2 – 0.8 мг/мл; 3 – 1.6 мг/мл; 4 – 4 мг/мл; 5 – 8 мг/мл; 6 – 12 мг/мл; 7 – 16 мг/мл.

лизированный деструктор хитозана, слабо активный в отношении хитина. Данный штамм был способен к активному росту и деградации полисахарида при рН 3.5–5.0 (Терегулова и соавт., 2016). При статическом культивировании в жидкой среде Чапека, дополненной растворимым хитозаном в концентрациях 0.8–4 мг/мл, рост фитопатогенных микромицетов снижался на 60–90% либо полностью ингибировался, тогда как выход сухой биомассы *Penicillium* sp. IB-37-2A поэтапно возрастал на 10–35% с повышением концентрации хитозана (рис. 8). Сравнение данного штамма с неактивным представителем того же рода, *P. funiculosum* IB Г-30, в условиях глубинного культивирования при интенсивном перемешивании в среде, дополненной источниками органического азота (пептон, дрожжевой экстракт и т.п.), также показало существенные различия в устойчивости этих культур. Так, нами не было выявлено подавления роста *Penicillium* sp. IB-37-2A при концентрациях хитозана до 16 мг/мл, напротив, при максимальном содержании полисахарида в среде, рост гриба активировался почти 6-кратно (рис. 9). Интересно, что штамм *P. funiculosum* IB Г-30, несмотря на отсутствие хитозаназной активности, также увеличивал свой рост при концентрациях хитозана до 4 мг/мл и был существенно более устойчив в сравнении с фитопатогенными микромицетами. Повышение концентраций хитозана до 12–16 мг/мл приводило лишь к 2-кратному снижению выхода биомассы *P. funiculosum* IB Г-30 (рис. 9). Рост *Penicillium* sp. IB-37-2A в изученном интервале концентраций хитозана хорошо коррелировал с продукцией грибом внеклеточной хитозаназы (рис. 10).

Полученные результаты свидетельствуют, что хитозан-деградирующие микромицеты характеризуются более высоким порогом чувствительности к хитозану в сравнении со спорообразующими бактериями, продуцирующими хитозаназы. Важной особенностью *Penicillium* sp. IB-37-2A, которая в значительной степени может определять его высокую устойчивость, является синтез им индуцибельной экзо-хитозаназы (экзо- β -1,4-глюкозаминидазы), основным продуктом которой является мономер, D-глюкозамин, не проявляющий антигрибной или антибактериальной активности. Довольно необычным явлением следует считать преимущественную специализацию *Penicillium* sp. IB-37-2A в деградации хитозана, поскольку в природе хитозан встречается гораздо реже хитина. Эти данные являются наглядной иллюстрацией к той точке зрения, что повышенная устойчивость хитозан-деградирующих микроорганизмов к хитозану может быть случайным совпадением, обычным преимуществом этих видов в борьбе за источники питания, а не связана с целенаправленной стратегией выработки устойчивости к данному полисахариду (Viens et al., 2015). Высокую устойчивость к хитозану по сравнению с бактериями показыва-

ют также неактивные по хитозаназе представители пенициллов, тогда как чувствительность фитопатогенных грибов сопоставима с показателями бактерий.

Таким образом, способность к синтезу внеклеточных хитозаназ очевидно определяет повышенную устойчивость к хитозану, как бактерий, так и микромицетов. Продукция бактериями только хитиназа не гарантирует наличия у них таких свойств, на что указывает высокая чувствительность к хитозану хитинолитических штаммов *B. atrophaeus* IB-33-1 и *B. licheniformis* IB-A41.4.2, сравнимая с чувствительностью неактивных штаммов бактерий. Наиболее интенсивный рост активных штаммов бактерий в интервале сублетальных концентраций хитозана, как и максимальный выход мицелия *Penicillium* sp. IB-37-2A, сопровождались наиболее значительной секрецией хитозаназ. В то же время, уровень продукции хитозаназы бактериями не может служить индикатором их относительной устойчивости, то есть нельзя говорить о прямой корреляции этих показателей. Вероятно, устойчивость хитозан-деградирующих микроорганизмов к хитозану может зависеть от механизма действия продуцируемых хитозаназ. Это подтверждается высокой устойчивостью хитозан-деградирующего гриба *Penicillium* sp. IB-37-2A, продуцирующего преимущественно экзо- β -1,4-глюкозаминидазу. В целом, следует отметить, что хитозан-деградирующие микромицеты, по всей видимости, проявляют большую устойчивость по сравнению с бактериями – продуцентами хитозаназ. В сублетальных концентрациях хитозан мог активировать рост бактерий, в том числе, неактивных. Так, при концентрации ≤ 0.25 мг/мл, наряду с активацией роста, у штамма *B. subtilis* IB-54 отмечалась стимуляция антагонистической активности и повышенная секреция антигрибных соединений (данные не представлены). Это факт показывает, что устойчивые к хитозану бактерии-антагонисты могут иметь хороший потенциал для применения в составе комбинированных препаратов защиты и стимуляции роста растений на основе хитозана или его олигомеров.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 16-14-00046.

Исследования проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования “БиоАналит” УИБ УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Терегулова Г.А., Мелентьев А.И. Синтез экзо- β -глюкозаминидазы грибом *Penicillium* sp. IB-37-2 // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 5. С. 520–526.
- Aktuganov G.E., Galimzyanova N.F., Teregulova G.A., Melentjev A.I. Synthesis of exo- β -glucosaminidase by fungus

- Penicillium* sp. IB-37-2 // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 531–536.
- Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры // ЖМЭИ. 2009. № 5. С. 91–97.
- Терегулова Г.А., Галимзянова Н.Ф., Актуганов Г.Э. Особенности синтеза внеклеточной хитозаназы новым хитозан-деградирующим штаммом *Penicillium glabrum* IB-37-2-4.0-A // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3. С. 26–30.
- Aam B., Heggset E., Norberg A., Sørli M., Vårum K., Ejsink V. Production of chitooligosaccharides and their potential application in medicine. Review // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 1482–1517.
- Brzezinski R. Uncoupling chitosanase production from chitin // Bioeng. Bugs. 2011. V. 2. P. 226–229.
- Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H., Chan W.Y. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 5156–5186.
- Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pintado M.E., Xavier Malcata F. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation // Ultramicroscopy. 2009. V. 109. P. 854–860.
- Ghinat M.G., Roy S., Poulin-Laprade D., Lacombe-Harvey M.-É., Morosoli M., Brzezinski R. Chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): Biochemical properties and role in protection against antibacterial effect of chitosan // Biochem. Cell Biol. 2010. V. 88. P. 907–916.
- Gil G., del Monaco S., Cerrutti P., Galvagno M. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts // Biotechnol. Lett. 2004. V. 26. P. 569–574.
- Helander I.M., Nurmiäho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria // Int. J. Food Microbiol. 2001. V. 71. № 2–3. P. 235–244.
- Ilyina A.V., Tikhonov V.E., Albulov A.I., Varlamov V.P. Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan // Process Biochem. 2000. V. 35. P. 563–568.
- Kapaun E., Reisser W. A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*) // Planta. 1995. V. 197. P. 577–582.
- Kendra D.F., Hadwiger L.A. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum* // Exp. Mycol. 1984. V. 8. P. 276–281.
- Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage // Int. J. Food Microbiol. 2004. V. 95. P. 147–155.
- Palma-Guerrero J., Lopez-Jimenez J.A., Pérez-Berná A.J., Huang I.C., Jansson H.B., Salinas J., Villalain J., Read N.D., Lopez-Llorca L.V. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. P. 1021–1032.
- Park Y., Kim M.H., Park S.C., Cheong H., Jang M.K., Nah J.W., Hahm K.S. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. P. 1729–1734.
- Raafat D., Sahl H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey // Microbial Biotechnol. 2009. V. 2. P. 186–201.
- Savard T., Beaulieu C., Boucher I., Champagne C.P. Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables // J. Food Prot. 2002. V. 65. P. 828–833.
- Takeda H. Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis* // Phytochemistry. 1995. V. 40. P. 457–459.
- Tao Y., Qian L.-H., Xie J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* // Carbohydr. Polym. 2011. V. 86. P. 969–974.
- Tokura S., Ueno K., Miyazaki S., Nishi N. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan // Macromol. Symp. 1997. V. 120. P. 1–9.
- Viens P., Lacombe-Harvey M.-É., Brzezinski R. Chitosanases from family 46 of glycoside hydrolases: from proteins to phenotypes // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 6566–6587.
- Xia W., Liu P., Zhang J., Chen J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides // Food Hydrocolloids. 2011. V. 25. P. 170–179.
- Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 1133–1174.
- Zhao Y., Park R.-D., Muzzarelli R.A.A. Chitin deacetylases: properties and applications. Review // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 24–46.

Chitosan Resistance in Bacteria and Micromycetes Differing in Ability to Produce Extracellular Chitinases and Chitosanases

G. E. Aktuganov^{1,*}, V. R. Safina¹, N. F. Galimzianova¹, L. Yu. Kuz'mina¹, E. A. Gilvanova¹, T. F. Boyko¹, and A. I. Melent'ev¹

¹Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Россия

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Received January 30, 2018

Abstract—Effect of chitosan on growth and development of bacterial and fungal strains differing in their ability to synthesize chitinases and chitosanases was explored. Bacterial cultures simultaneously producing chitinases and chitosanases were found to be more resistant to soluble chitosan than both the strains synthesizing only chitinases and inactive bacteria. *Paenibacillus ehimensis* strain IB-739, which was characterized by inducible synthesis of chitinases and chitosanases, exhibited the highest resistance (minimal bactericidal chitosan concentration 14–15 mg/mL). No direct correlation was revealed between the level of chitosanase production by bacteria and their resistance to chitosan. Sublethal concentrations of chitosan promoted the growth of several bacterial strains; the most intensive growth of chitosan-degrading bacteria correlated with

the maximal values of their chitosanase production. Within the concentration range studied (≤ 16 mg/mL), no inhibitory action of chitosan against exo-1,4- β -glucosaminidase-producing strain *Penicillium* sp. IB-37-2A was observed. Compared to inactive fungal cultures, the growth of this fungus was significantly activated in presence of chitosan; the maximal concentration of this polysaccharide resulted in a sixfold increase of *Penicillium* sp. IB-37-2A biomass yield.

Keywords: chitosan, chitosanase, chitinase, bacteria, micromycetes, antimicrobial activity, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Penicillium*

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ БЕТАИНИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОХИТОЗАНА

© 2018 г. И. В. Благодатских^{a, *}, О. В. Вышиванная^a, А. В. Александрова^{a, b}, Е. А. Безродных^a,
П. В. Зеленихин^c, С. Н. Куликов^{c, d}, В. Е. Тихонов^a

^aИнститут элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия

^bМосковский технологический университет Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

^cКазанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Казань, Россия

^dКазанский федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: blago@ineos.ac.ru

Поступила в редакцию 21.03.2018 г.

Существенным ограничением для создания биологически активных лекарственных форм на основе хитозана и олигохитозана является потеря ими растворимости при значениях pH выше 6.2–6.5 и ухудшение абсорбционной способности при переходе к нейтральным и щелочным условиям среды. С целью создания нецитотоксичных производных хитозана, сохраняющих высокую антибактериальную активность в слабощелочных физиологических средах, синтезированы щелочерастворимые производные олигохитозана и низкомолекулярного хитозана путем введения бетаиновых заместителей по атому азота и проведены сравнительные исследования pH области растворимости в зависимости от длины цепи и от степени модификации при $M_w = 9.7 \pm 1.7$ кДа. Найдено, что степень модификации бетаиновым лигандом 12 мол. % является оптимальной и обеспечивает существование однофазного раствора модифицированного олигохитозана ($M_w = 2–10$ кДа) во всей области pH. Изучение антибактериальной активности бетаинированных производных хитозана в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий показало их высокий антибактериальный эффект как в слабокислой, так и в слабощелочной среде. Установлено, что бетаинированные производные в исследованном диапазоне концентраций (0.2–2.5 мг/мл) не проявляли цитотоксичности по отношению к клеткам эпителия легкого эмбриона коровы. Отсутствие цитотоксичности в отношении клеток млекопитающих, а также выраженная антимикробная активность в слабощелочных физиологических средах предполагает возможность использования полученных производных в биомедицинских композициях.

Ключевые слова: антимикробный эффект, цитотоксичность, хитозан, олигохитозан, кватернизация, растворимость

DOI: 10.1134/S002636561805004X

В настоящее время наблюдается опасная тенденция постоянного роста количества антибиотикорезистентных бактерий, особенно среди возбудителей клинических инфекций. В связи с этим во всех развитых странах стимулируются исследования, направленные на создание новых нетоксичных альтернативных антибиотикам биоцидных препаратов для парэнтерального применения, а также развития альтернативных видов терапии, основанных на принципах целевой доставки препаратов и максимальном применении нетоксичных биосовместимых носителей. Одним из таких возможных носителей является хитозан и его нетоксичные производные. Важными преимуществами хитозана при его выборе в качестве основы транспортных средств являются выраженные мукоадгезивные свойства и способность

инициировать открытие плотных контактов, т.е. стимулировать абсорбцию переносимых веществ как по трансцеллюлярному, так и по парацеллюлярному пути. Однако существенным ограничением для создания биологически активных лекарственных форм на его основе как для парэнтерального, так и энтерального применения являются потеря хитозаном растворимости при значениях pH выше 6.5 и ухудшение антимикробной активности при переходе к нейтральным и щелочным средам, соответствующим условиям кишечника и межклеточного пространства млекопитающих.

При этих условиях очевидным решением проблемы растворимости хитозана является введение дополнительных ионогенных групп, таких как четвертичные аммониевые группы, положительно заряженные во всей области pH, путем ал-

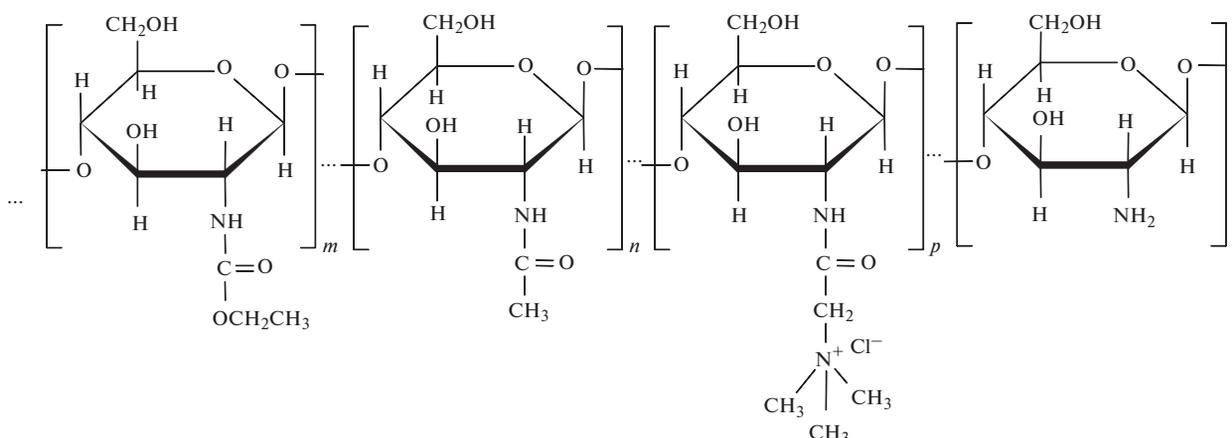


Рис. 1. Производные олигохитозана и низкомолекулярного хитозана.

килирования хитозана или реакцией хитозана с соединением, содержащим в своей структуре четвертичную триметиламмониевую группу (Нудьга и соавт., 1973; Muzzarelli et al., 1983; Domard et al., 1986; Loubaki et al., 1991; Le Dung et al., 1994; Sieval et al., 1998; Zhishen et al., 2001; Hamman, Kotzé, 2001; Snyman et al., 2002; Polnok et al., 2004; Spinelletti et al., 2004; Ignatova et al., 2006; Lim, Hudson, 2004; Loubaki et al., 1989). Несмотря на кажущуюся простоту процессов, то обстоятельство, что в используемых реакционных средах хитозан нерастворим и находится в виде дисперсии, приводит к неравномерному распределению триметиламмониевых групп по цепи полимера и к частичной деструкции макромолекул.

В наших работах (Stepnova et al., 2006, 2007) был предложен мягкий одностадийный метод бетаинирования в гомогенных условиях в присутствии в качестве связывающего реагента 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохитолина (EEDQ).

Использование частично бетаинированного хитозана для получения полиэлектролитных комплексов, растворимых при физиологических значениях pH (слабокислых, нейтральных, слабощелочных), представляется перспективным с точки зрения создания векторов доставки лекарственных средств или генетического материала.

Целью настоящей работы явилось создание нецитотоксичных производных олигохитозана и низкомолекулярного хитозана, сохраняющих высокую антибактериальную активность в слабощелочных физиологических средах. Для этого проведены синтез и исследование свойств растворов и pH-диапазона растворимости бетаиновых производных олигохитозана и низкомолекулярного хитозана в зависимости от содержания лиганда и молекулярной массы (ММ) в растворителях различной ионной силы, а также оценены биологические свойства полученных производных: цито-

токсичность по отношению к клеткам млекопитающих и антибактериальная активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез производных хитозана. Ряд бетаинированных производных олигохитозана и низкомолекулярного хитозана (рис. 1) был получен по методу (Stepnova et al., 2007), используя набор олигохитозанов различного молекулярного веса. При этом происходило частичное *N*-этоксикарбонилирование олигохитозана. Состав продуктов, определенный методом ^1H ЯМР (Hirai et al., 1991), и молекулярно-массовые характеристики, определенные методом эксклюзионной хроматографии по методике (Blagodatskikh et al., 2017), приведены в табл. 1.

Определение pH-области растворимости и структуры растворов. Растворы бетаинированных хитозанов ($c = 5$ мг/мл) в 0.1 М уксусной кислоте фильтровали через мембранный фильтр Dugarog 0.45 мкм в оптическую кювету. Анализировали полученные растворы методом рассеяния света. Далее в раствор помещали магнитную мешалку и при перемешивании непосредственно в pH-метре добавляли малыми порциями раствор TRIS (до pH 8.5) или NaOH (после pH 8.5) и измеряли pH. После каждого добавления проводили измерение рассеяния света под углом 90° . По полученным данным строили кривые титрования в виде зависимости интенсивности рассеянного света I и гидродинамического радиуса R_h от pH раствора. Точку фазового разделения определяли по началу резкого роста интенсивности рассеяния и размера частиц.

Исследования по рассеянию света проводили на спектрометре "Photocor Complex" (Россия), снабженном автоматическим гониометром и псевдокорреляционной системой счета фотонов "PhotoCor-PC2". Коррелятор реального времени

Таблица 1. Молекулярные характеристики бетаинированных хитозанов и критические значения pH фазового расслоения (pH_c)

Образец	Q*, %	R**, %	M _w	M _n	pH _c (AcOH)	pH _c (NaCl)
Q2-283	14	19	2000	1000	Нет	Нет
Q2-296	12	17	5700	2440	Нет	Нет
Q1-287	23	27	11450	5200	9.5	9.7
Q2-287	12	18	9500	3740	Нет	Нет
Q3-287	4	6	8120	4250	7.7	8.1
Q2-277	13	14	24500	7300	7.8	7.7
Q2-241	12	17	26500	7600	7.8	7.6
Q2-334-8	12	16	42000	11200	7.4	7.2

* Мольный % бетаинированных звеньев.

** Мольный % этоксиэтилированных звеньев.

“PhotoCor-FC” использован в логарифмической конфигурации (интервал времен задержки 0.01–5 × 10⁵ мс). В качестве источника света использован He-Ne лазер “Uniphase 1135P” (λ = 633 нм, мощность 10 мВт). Для получения кривых титрования измерения проводили под углом 90°. Для изучения структуры растворов измерения проводили в разбавленных растворах в интервале углов 30°–140°. Распределение по временам релаксации τ рассчитывали из корреляционных функций по методу CONTIN. Значения гидродинамического радиуса рассчитывали по уравнению Стокса–Эйнштейна $R_h = kT/6\pi\eta D$, где k – константа Больцмана, η – вязкость растворителя, $D = 1/\tau q^2$ – коэффициент диффузии (q – величина волнового вектора). Кажущийся M_w и радиус инерции R_g определяли по методу Зимма:

$$Kc/R_\theta = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle q^2 \right).$$

Измерение ζ-потенциала растворов проводили на приборе “Photocor Compact-Z” (Россия). Измерение проводили под углом 20°.

Исследование биологической активности. Антибактериальную активность по отношению к *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 35591 проводили по методике, описанной в работах (Kulikov et al., 2016a; 2016b).

Цитотоксичность производных олигохитозана и хитозана характеризовали цитометрически *in vitro* по отношению к клеткам эпителия легкого эмбриона коровы (ЛЭК) с использованием двойного окрашивания потенциал-зависимым красителем DIOC₆ и йодидом пропидия (PI) (Kulikov et al., 2016b). Жизнеспособными клетками считали те, которые обладали высоким мембранным потенциалом митохондрий (DIOC₆-положительные) и некомпрометированной мембраной (PI-отрицательные). Полученные результаты сравнивали с вариантами без обработки хитозанами, а также с

обработкой камптотецином (10 мкМ) – индуктором апоптоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства растворов бетаинированных хитозанов и фазовое поведение в зависимости от pH среды. В настоящей работе методом кислотной деструкции высокомолекулярного хитозана (Kulikov et al., 2012) получена серия олигохитозанов и низкомолекулярных хитозанов с разной ММ и низкой степенью ацетилирования (1–2%) и проведена их модификация биосовместимым нетоксичным лигандом бетаином по разработанной нами ранее методике (Stepnova et al., 2006; 2007) с целью введения в цепь полимера различного количества четвертичных аммониевых групп. Молекулярные характеристики образцов показаны в табл. 1.

Полученные образцы частично бетаинированных хитозанов разной степени модификации и разной ММ использованы для экспериментального исследования pH-диапазона растворимости в среде с разной ионной силой (0.1 М CH₃COOH и раствор 0.15 М NaCl). С этой целью раствор полимера титровали раствором основания (TRIS до pH 8.5, затем NaOH), начало фазового расслоения определяли по началу резкого роста интенсивности рассеяния света, которое сопровождалось ростом размера частиц. Известно, что растворы хитозанов и олигохитозанов (Blagodatskikh et al., 2013; Филиппова, Корчагина, 2012) частично агрегированы в растворах и кривые распределения по размерам содержат обычно 2 моды: быстрая соответствует макромолекулам, медленная – агрегатам, при этом размер агрегатов зависит от способа подготовки растворов (Blagodatskikh et al., 2013).

Пример кривых титрования для бетаинированных олигохитозанов и хитозанов разной молекулярной массы со степенью кватернизации 12–14% показан на рис. 2, в качестве размера частиц ис-

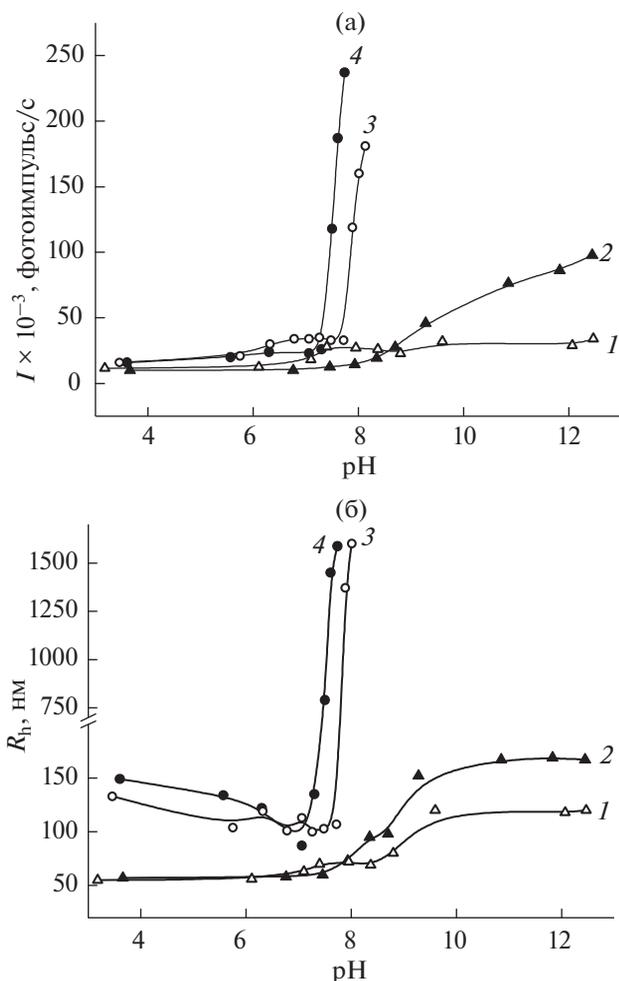


Рис. 2. Изменение (а) интенсивности рассеяния света и (б) размеров агрегатов образцов бетаинированного олигохитозана с разной молекулярной массой, содержащих 12–14 мол. % бетаинированного лиганда: 1 – Q2-296; 2 – Q2-287; 3 – Q2-241; 4 – Q2-334-8 в растворе 0.1 М уксусной кислоты при изменении рН среды.

пользован размер агрегатов. Результаты исследования фазового поведения образцов приведены в табл. 1.

Как можно видеть из рис. 2, наиболее высокомолекулярные бетаинированные хитозаны подвергались фазовому расслоению в слабощелочной среде в отличие от олигохитозанов ($M_w \leq 10$ кДа), растворы которых оставались прозрачными и устойчивыми во всей щелочной области, а распределения по размерам оставались бимодальными. Небольшое увеличение размеров агрегатов наблюдали после рН 9, т.е. после перехода к титрованию более сильным основанием (NaOH вместо TRIS).

На рис. 3 представлены распределения по размерам частиц в растворах бетаинированного олигохитозана Q2-287 при разных значениях рН. Из рисунка видно, что структура растворов бетаинированного производного как в кислой, так и в ще-

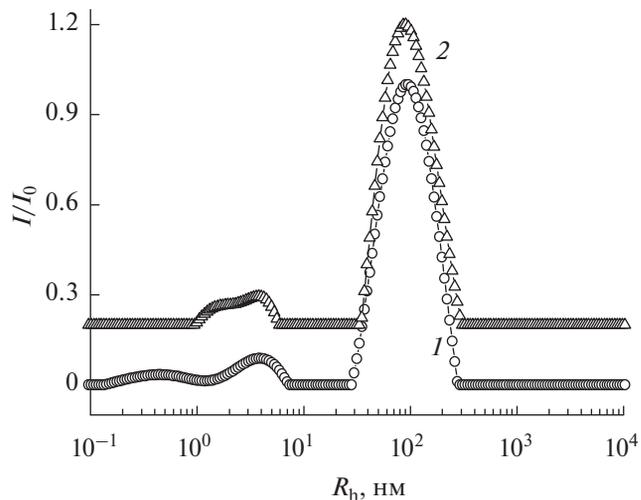


Рис. 3. Распределения интенсивности рассеянного света по размеру частиц в растворах бетаинированного хитозана Q2-287 в 0.1 М уксусной кислоте при разных рН: 1 – 6.37; 2 – 8.50.

лочной среде (рН 8.5) подобна структуре растворов исходного олигохитозана при аналогичной подготовке раствора (тип мембраны, размер пор), размер агрегатов остается неизменным при переходе к щелочным условиям. Этот вывод подтверждается результатами электронно-микроскопического исследования (рис. 4). Из данных ПЭМ следует, что растворы содержат сферические агрегаты, оценка размеров агрегатов по данным ПЭМ $40 \text{ нм} \pm 20\%$, что хорошо согласуется с полученными ранее данными для немодифицированных олигохитозанов и с результатами статического и динамического рассеяния света бетаинированных образцов. Измеренные в растворе 0.15 М NaCl величины радиусов инерции агрегатов $R_g = 60\text{--}100$ нм и значения фактора асимметрии $R_g/R_h = 1.2 \pm 0.2$ согласуются с предположением о довольно компактной структуре агрегатов близкой по форме к сферической.

Анализ фазового поведения олигохитозанов ($M_w = 9.7 \pm 1.7$ кДа) с разной степенью модификации свидетельствует о том, что уже при минимальной степени модификации (4%) наблюдается значительное расширение области растворимости, что позволяет использовать растворы таких производных в слабощелочных средах, в том числе, в средах, близких по составу к физиологическим жидкостям. Оптимальной степенью кватернизации (содержанием четвертичных аммониевых групп в цепи), обеспечивающей растворимость во всей области щелочных значений рН, является величина 12%. При более высокой степени модификации наблюдалось расслоение в сильнощелочной среде, причина которого требует дополнительных исследований. Можно предположить, что такая

закономерность связана с особенностью изменения состава полимера при увеличении степени модификации. Как было показано в нашей предыдущей работе (Stepnova et al., 2006), разработанный нами метод бетаинирования сопровождается введением дополнительных относительно гидрофобных *N*-этоксикарбонильных групп в цепь хитозана. При этом, как видно из табл. 1, их содержание тем выше, чем выше степень кватернизации. Таким образом, повышение степени кватернизации бетаиновых производных сопровождается сложным изменением гидрофильно-гидрофобного баланса, что может привести к появлению области оптимального для растворимости состава производных.

Надо подчеркнуть, что отмеченное сужение области растворимости, тем не менее, не играет существенной роли для биологического применения, так как расслоение начинается только в сильнощелочной среде при $\text{pH} > 9$. При титровании растворов кватернизованных хитозанов с повышением pH наблюдали закономерное понижение ζ -потенциала. Например, при титровании образца Q1-287 в 0.025 М уксусной кислоте ζ -потенциал изменялся от $+12 \pm 0.2$ при pH 4.6, до $+2.7 \pm 0.3$ при pH 8.0 и $+0.9 \pm 0.2$ при pH 9.0.

Титрования растворов модифицированных хитозанов и олигохитозанов, проведенные в 0.15 М растворе NaCl, показали, что их фазовое поведение аналогично поведению в бессолевой среде, при этом получены близкие значения pH_c (табл. 1).

Антибактериальная активность и цитотоксичность бетаинированных хитозанов. Исследования антибактериальных свойств полученных бетаинированных олигохитозанов и хитозанов были проведены с использованием двух микроорганизмов, различающихся строением клеточной стенки. Антибактериальный эффект оценивался в слабокислой (pH 6.4) и слабощелочной (pH 7.4) средах. В слабокислых условиях растворимы хитозаны с различной молекулярной массой – от олигохитозанов до низкомолекулярных и высокомолекулярных образцов. В этих условиях хитозановые полимеры обладают выраженным антибактериальным действием в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Куликов и соавт., 2016а). При этом антибактериальная активность в таких условиях возрастает с увеличением молекулярной массы хитозана. В щелочных условиях практически все немодифицированные хитозаны в значительной степени или полностью теряют свои антибактериальные свойства. Заметную антибактериальную активность сохраняют только олигохитозаны с молекулярной массой около 5 кДа (Куликов и соавт., 2016а). Результаты исследования антибактериальной активности бетаинированных олигохито-

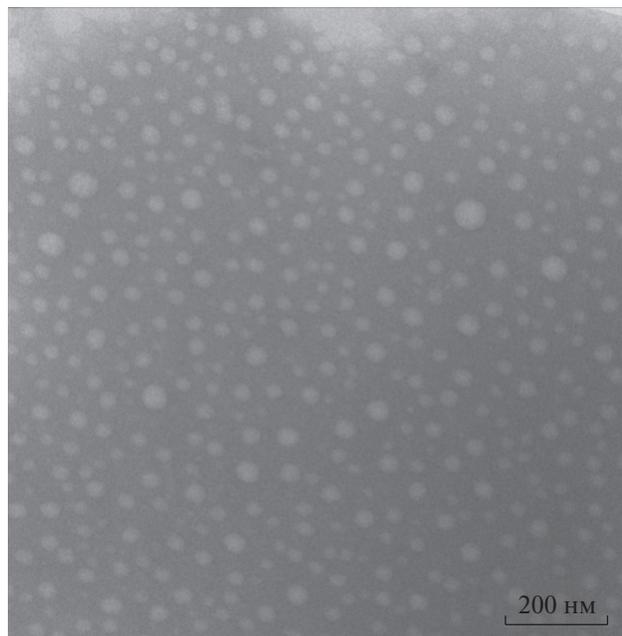


Рис. 4. ПЭМ микрофотографии образцов растворов Q2-287 при pH 8.5 (фильтрация через пористую мембрану 0.45 мкм).

занов и хитозанов в отношении *S. aureus* и *E. coli* представлены в табл. 2. Полученные данные указывают на наличие антибактериальной активности производных хитозана как в слабокислом растворе, так и сохранение высокого антибактериального эффекта в слабощелочном растворе. При этом антибактериальная активность бетаинированных олигохитозанов и хитозанов сохраняет характер своей зависимости от молекулярной массы полимера при переходе из кислых в щелочные условия, чем отличается от характера изменения зависимости в случае использования немодифицированных образцов (Куликов и соавт., 2016а). Это может свидетельствовать о том, что те свойства поликатиона, которые определяют его антибактериальное действие, в исследуемом диапазоне кислотности среды (pH 6.4–7.4) изменяются незначительно, и величина проявления биологического эффекта определяется в первую очередь степенью полимеризации макромолекул.

Отмечено также, что как немодифицированные, так и бетаинированные производные хитозана имеют меньшую величину МИК в отношении *E. coli*, чем *S. aureus*. Более высокая антибактериальная активность поликатионов в отношении *E. coli* противоречит ранее высказанному предположению о более сильном взаимодействии положительно заряженных полимеров с отрицательно заряженной клеточной стенкой грамположительных бактерий (Kong et al., 2010). Однако на поверхности грамотрицательных бактерий в составе внешней

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) олигохитозана и хитозана и их бетаинированных производных по отношению к *S. aureus* и *E. coli*

Образец	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	МИК, рН 6.4	МИК, рН 7.4	МИК, рН 6.4	МИК, рН 7.4
Q2-283	512	512	128	128
283	512	1024	128	128
Q2-296	62	128	32	64
296	62	512	32	256
Q2-287	16	124	8	32
287	16	512	8	512
Q2-277	8	93	8	32
277	16	1024	8	1024
Q2-241	8	62	8	32
241	16	>1024	8	>1024
Q2-334-8	8	62	8	32
334-8	16	>1024	8	>1024

мембраны находится большое количество фосфолипидов и липополисахаридов (ЛПС), которые обладают отрицательным зарядом за счет фосфатных, пирофосфатных и карбоксильных групп. Помимо этого связывание ЛПС с поликатионами протекает также с участием гидрофобной липидной компоненты (Brandenburg et al., 1998). Благодаря этому хитозан образует устойчивые комплексы с ЛПС, модифицирует его биологические свойства (Давыдова и соавт., 2000; Заводинский и соавт., 2003), а значит, может обуславливать и гибель бактериальной клетки (Kumar et al., 2005).

Установлено, что бетаинированные хитозаны в исследованном диапазоне концентраций (0.2–2.5 мг/мл) не проявляли цитотоксической активности (табл. 3) по отношению к клеткам ЛЭК. Для хитозанов, в целом, характерна низкая токсичность по отношению к нормальным клеткам. В то же время, некоторые олигохитозаны с определенными молекулярно-массовыми характеристиками обладали способностью индуцировать апоптоз опухолевых клеток, как это было установлено нами ранее (Kulikov et al., 2016b). Известно, что сочетание определенных молекулярных детерминант в молекулах некоторых олигохитозанов позволяет им проявлять значительную антибактериальную и фунгистатическую активност

Таблица 3. Выживаемость клеток ЛЭК при разных концентрациях бетаинированных олигохитозанов

Образец	% выживших клеток при концентрации образца с, мг/мл		
	0.2	1.0	2.5
Q2-283	98.7 ± 1.2	98.0 ± 1.2	95.0 ± 3.2
Q2-296	95.5 ± 2.0	94.4 ± 3.2	95.5 ± 2.5
Q2-287	98.0 ± 1.3	97.9 ± 2.2	98.4 ± 1.2
Q1-287	95.1 ± 3.0	95.1 ± 2.9	95.4 ± 1.7
Камфотерицин	60.1 ± 4.5		

сти (Kulikov et al., 2014; Kulikov et al., 2016). Отсутствие цитотоксичности исследованных образцов бетаинированных хитозанов, наряду с их высокой антибактериальной активностью, позволяет рассчитывать на возможность их использования для прикладных биотехнологических и биомедицинских целей (Cheung et al., 2015).

Определение антимикробной активности и цитотоксичности выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-14-00046. Цитометрические исследования частично проведены в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И., Красикова И.Н., Соловьева Т.Ф. Взаимодействие бактериальных эндотоксинов с хитозаном. Влияние структуры эндотоксина, молекулярной массы хитозана и ионной силы раствора на процесс комплексообразования // Биохимия. 2000. Т. 65. № 9. С. 1278–1287.
- Davydova V.N., Yermak I.M., Gorbach V.I., Krasikova I.N., Solov'eva T.F. Interaction of bacterial endotoxins with chitosan. Effect of endotoxin structure, chitosan molecular mass, and ionic strength of the solution on the formation of the complex // Biochemistry (Moscow). 2000. V. 65. P. 1082–1090.
- Заводинский В.Г., Гниденко А.А., Давыдова В.Н., Ермак И.М. Компьютерное моделирование взаимодействия бактериального эндотоксина с поликатионом-хитозаном // Химия и компьютерное моделирование. Бултеровские сообщения. 2003. Т. 2. № 11. С. 11–12.
- Куликов С.Н., Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Зеленихин П.В., Сальникова М.М., Безродных Е.А., Тихонов В.Е. Определение антибактериальной активности

- хитозана // Прикл. биохимия и микробиология. 2016а. Т. 52. № 5. С. 489–494.
- Kulikov S.N., Bayazitova L.T., Tyupkina O.F., Zelenikhin P.V., Salnikova M.M., Bezrodnykh E.A., Tikhonov V.E.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2016а. V. 52. P. 502–507.
- Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н.* О-алкилирование хитозана // Ж. общей химии. 1973. Т. 43 № 12. С. 2756–2760.
- Филиппова О.Е., Корчагина Е.В.* Хитозан и его гидрофобные производные: Получение и агрегация в разбавленных водных растворах // Высокомолек. соединения. А. 2012. Т. 54. № 7. С. 1130–1152.
- Philippova O.E., Korchagina E.V.* Chitosan and its hydrophobic derivatives: Preparation and aggregation in dilute aqueous solutions // Polymer Science. Series A. 2012. V. 54. P. 552–572.
- Blagodatskikh I.V., Bezrodnykh E.A., Abramchuk S.S., Muranov A.V., Sinitsyna O.V., Khokhlov A.R., Tikhonov V.E.* Short chain chitosan solutions: self-assembly and aggregates disruption effects // J. Polym. Res. 2013. V. 20. № 2. P. 73.
- Blagodatskikh I.V., Kulikov S.N., Vyshivannaya O.V., Bezrodnykh E.A., Tikhonov V.E.* N-Reacetylated oligochitosan: pH dependence of self-assembly properties and antibacterial activity // Biomacromol. 2017. V. 18. P. 1491–1498.
- Brandenburg K., Koch M.H., Seydel U.* Biophysical characterization of lysozyme binding to LPS Re and lipid A // Eur. J. Biochem. 1998. V. 258. P. 686–695.
- Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H., Chan W.Y.* Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 5156–5186.
- Domard A., Rinaudo M., Terrassin G.* New method for the quaternization of chitosan // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. P. 105–107.
- Hamman J.H., Kotzé A.F.* Effect of the type of base and number of reaction steps on the degree of quaternization and molecular weight of N-trimethyl chitosan chloride // Drug. Dev. Ind. Pharm. 2001. V. 27. P. 373–380.
- Hirai A., Odani H., Nakajima A.* Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy // Polym. Bull. 1991. V. 26. P. 87–94.
- Ignatova M., Starbova K., Markova N., Manolova N., Rashkov I.* Electrospun nanofibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol) // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 2098–2107.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review // Int. J. Food Microbiol. 2010. V. 144. P. 51–63.
- Kulikov S.N., Lisovskaya S.A., Zelenikhin P.V., Bezrodnykh E.A., Shakirova D.R., Blagodatskikh, I.V., Tikhonov V.E.* Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight–activity relationship // Eur. J. Med. Chem. 2014. V. 74. P. 169–178.
- Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh I., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khairullin R., Philippova Yu., Abramchuk S.* Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Carbohydr. Polym. 2012. V. 87. P. 545–550.
- Kulikov S., Zelenikhin P., Murtazina R., Khayrullin R., Bezrodnykh E., Tikhonov V.* Induction of apoptosis of tumor cells by oligochitosan (short chain chitosan) // Bio-NanoSci. 2016b. V. 6. № 4. P. 460–463.
- Kumar A.B.V., Varadaraj M.C., Gowda L.R., Tharanathan R.N.* Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* // Biochem. J. 2005. V. 391. P. 167–175.
- Muzzarelli R.A.A., Tanfani F.* N-permethylation of chitosan and preparation of N-trimethyl iodide // Carbohydr. Polym. 1983. V. 5. P. 297–307.
- Le Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrieres J.* Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modification of chitosan // Carbohydr. Polym. 1994. V. 24. P. 209–214.
- Lim S.H., Hudson S.M.* Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. P. 313–319.
- Loubaki E., Sicsic S., Le Goffic F.G.* Modification chimique du chitosane avec la 5-gluconolactone, la 3-propiolactone et le glycidol // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. P. 379–384.
- Loubaki E., Ourevitch M., Sicsic S.* Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride characterization of modified chitosan by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy // Eur. Polym. J. 1991. V. 27. P. 311–317.
- Polnok A., Borchard G., Verhoef J.C., Sarisuta N., Junginger H.E.* Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004. V. 57. P. 77–83.
- Sieval A.B., Thanou M., Vehoef J.C., Brussee J., Junginger H.E.* Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride // Carbohydr. Polym. 1998. V. 36. P. 157–165.
- Snyman D., Hamman J.H., Kotse J.S., Rollings J.E., Kotzé A.F.* The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride // Carbohydr. Polym. 2002. V. 50. P. 145–150.
- Spinelli V.A., Laranjeira M.C.M., Favere V.T.* Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium(VI) ion // React. Funct. Polym. 2004. V. 61. P. 347–352.
- Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A., Klemenkova Z.S., Yamskov I.A.* Unexpected reaction of chitosan with EEDQ // Mendeleev Commun. 2006. V. 16. № 5. P. 271–273.
- Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A., Klimova T.P., Vorontsov E.V., Babak V.G., Lopatin S.A., Yamskov I.A.* New approach to the quaternization of chitosan and its amphiphilic derivatives // Eur. Polym. J. 2007. V. 43. P. 2414–2421.
- Zhishen J., Dongfeng S., Weiling X.* Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan // Carbohydr. Res. 2001. V. 333. P. 1–6.

Betaine Derivatives of Oligochitosane: Antibacterial Activity and Cytotoxicity**I.V. Blagodatskikh^{1,*}, O.V. Vyshivannaya¹, A.V. Alexandrova², E.A. Bezrodnykh¹,
P.V. Zelenikhin³, S.N. Kulikov³, V.E. Tikhonov¹**¹*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences,
Federal Agency for Science and Education, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia*²*Moscow Technological University, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*³*Kazan Federal University, ul. Kremlyovskay, 18, Kazan, 420008 Russia*⁴*Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ul. Bolshaya Krasnaya. 67, Kazan, 420015 Russia***e-mail: blago@ineos.ac.ru*

Received March 21, 2018

Essential restriction for chitosan and oligochitosan applications in biomedical compositions is their insolubility in aqueous media above pH = 6.2–6.5 and corresponding deterioration of penetration thorough mucosa. To create non-cytotoxic chitosan derivatives with a high antibacterial activity in weakly alkaline physiological media, a series of alkali-soluble derivatives of oligochitosan and low molecular weight chitosan were synthesized by coupling betaine substituent to nitrogen atom of glucosamine units. Comparative studies of pH- region of derivative total solubility depending on the chain length and modification degree of oligochitosan with $M_w = 9.7 \pm 1.7$ kDa were carried out. It was found that 12 mol% of betaine substituents was the optimal modification degree ensuring the existence of a single-phase solution of modified oligochitosan ($M_w = 2–10$ kDa) in the entire pH region. The study of the antibacterial activity of betaine derivatives against gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria showed a high antibacterial effect in both weakly acidic and weakly alkaline environments. It was determined that betaine derivatives were non-toxic towards Cow lung epithelial cells (LEC) at concentration below 2.5 mg/ml. The results obtained seem promising for application these derivatives in biomedical compositions.

Keywords: antimicrobial effect, cytotoxicity, chitosan, oligochitosan, quaternization, solubility

ВЛИЯНИЕ ИЗОМЕРНОЙ ФОРМЫ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА АНТИБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЕЕ СОЛЕЙ С ХИТОЗАНОМ

© 2018 г. Н. О. Гегель^{а, *}, И. В. Зудина^б, О. Н. Малинкина^б, А. Б. Шиповская^б

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

^бСаратовский государственный университет Н.Г.Чернышевского, Саратов, Россия

*e-mail: gegelno@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2018 г.

Методом дисперсии оптического вращения установлено, что водный раствор хитозана в *L*-аскорбиновой кислоте показывает правое вращение и аномальную дисперсию, в *D*-аскорбиновой – левое вращение и нормальную дисперсию. Проведенное микробиологическое исследование и просвечивающая микроскопия выявили, что соль хитозана с *D*-аскорбиновой кислотой вызывает более глубокие, чем индивидуальный хитозан, деструктивные изменения клеточных структур, обуславливающие наибольшую антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* 209P и *Escherichia coli* 113-13.

Ключевые слова: хитозан, аскорбиновая кислота, стереоизомерия, антибактериальная активность

DOI: 10.1134/S0026365618050105

Наблюдаемый в последнее десятилетие всплеск интереса к биомедицинским аспектам применения хитозана (поли- β -(1,4)-2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы) отчасти обусловлен проблемой поиска принципиально новых антимикробных лекарственных средств, обладающих не только биоцидной активностью, но и способностью к иммуномодуляции и стимуляции процессов саногенеза (Куликов и соавт., 2015; Куликов, 2014; Шиповская и соавт., 2015). В многочисленных публикациях сообщается о способности хитозана и его производных подавлять рост патогенных бактерий и паразитических грибков благодаря его деструктивному воздействию на клеточные стенки микроорганизмов (Фассахов и соавт., 2009; Raafat et al., 2017).

Однако практическое применение хитозана зачастую ограничено его плохой растворимостью в воде. Вследствие этого при создании препаратов фармакологического назначения используют водорастворимые производные этого полимера, например, его соли с неорганическими и органическими кислотами. В частности, в практической медицине широко применяются различные композиции, включающие в свой состав аскорбат хитозана – соль хитозана и аскорбиновой кислоты. Выбор аскорбиновой кислоты в качестве органического лиганда в данном случае обусловлен ее особой биологической ролью в живом организме: она участвует во многих обменных процессах, стимулирует синтез коллагена и пролиферацию фибробластов, способствует поддержанию го-

меостаза в тканях. Сообщается, что препараты на основе аскорбата хитозана проявляют высокую антибактериальную активность и находят применение в гинекологии, в стоматологической практике, при лечении ран различного генеза (Большаков и соавт., 2011; Булкина и соавт., 2015).

Особенность аскорбата хитозана в том, что эта полисоль образуется в результате взаимодействия двух оптически активных химических веществ – хирального аминополисахарида и аскорбиновой кислоты, образующей четыре оптических изомера (*L*-(+), *D*-(-) и их диастереомеры). При этом следует отметить, что из четырех известных стереоизомеров биологически активной формой является только *L*-аскорбиновая кислота (левовращающий витамин С). Поэтому лекарственные препараты, содержащие аскорбиновую кислоту в виде смеси изомеров, могут существенно различаться своими фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, что не может не отразиться на эффективности проводимого лечения.

В связи с вышеизложенным, целью исследования было изучить влияние изомерных форм аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность ее солей с хитозаном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение солей аскорбиновой кислоты с хитозаном. В эксперименте изучали суточные растворы *L*- и *D*-изомеров аскорбиновой кислоты (*AscA*) и их солей с хитозаном. В качестве исходных субстан-

ций использовали *L*-AscA (ЗАО ФП “Мелиген”, п. Щеглово, Россия) и *D*-AscA (ЗАО “Химреактив”, Н. Новгород, Россия) аналитической степени чистоты, а также порошок водорастворимого гидрохлорида хитозана (CS·HCl) со средневязкостной молекулярной массой 38 кДа и степенью деацетилирования 80 мол. % (ЗАО “Биопрогресс”, Щелково, Россия).

Исходные 9%-ные растворы стереоизомеров Asc получили растворением навесок *L*- и *D*-AscA в воде при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в отсутствие естественного освещения. Выбор данной концентрации Asc обусловлен тем, что ее растворы с CS·HCl отличаются высокой вязкостью, удовлетворительной кинетической стабильностью и умеренной антибактериальной активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов (Игидбашян и соавт., 2014). Исходные растворы CS·HCl в *L*-AscA и *D*-AscA готовили порционным смешиванием навески порошка CS·HCl с 9%-ным водным раствором *L*- или *D*-AscA в количестве, обеспечивающем мольное соотношение CS·HCl : AscA = 1 : 0.6. Навески CS·HCl предварительно стерилизовали в ламинарном боксе “NUAIRE Biological Safeti Cabinets” (Франция) в течение 15 мин. При приготовления растворов использовали стерильную дистиллированную воду, дегазированную от CO₂ и O₂ кипячением при 100°C в течение 1 ч.

Оптическое вращение растворов регистрировали на автоматическом спектрополяриметре “СПУ-Е” (Россия) в диапазоне длины волны $\lambda = 280\text{--}710$ нм при 20°C. Использовали термостабируемые кюветы длиной 1 дм с кварцевыми окошками. Источник света – ртутная лампа высокого давления “ДРШ-250” (Россия). Условия эксперимента стандартные, погрешность измерений углов вращения не превышала ± 0.002 град. Удельное оптическое вращение $[\alpha]$ (град мл дм⁻¹ г⁻¹) растворов рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_{\lambda, \text{нм}}^{20^\circ\text{C}} = \frac{(\alpha - \alpha_0) \times 100}{C \ell},$$

где α и α_0 – измеряемые углы вращения раствора и растворителя соответственно, выраженные в градусах; C – концентрация раствора, г·(100 мл)⁻¹; ℓ – длина оптического пути, дм. Кривую ДОВ строили по результатам 3-х параллельных опытов.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре UV2550 “Shimadzu” (Япония) в интервале длины волны 220–500 нм с точностью ± 0.3 нм в кварцевых кюветах шириной 1 см относительно воды.

Антибактериальную активность определяли методом диффузии в агар с использованием модели грамположительный (*Staphylococcus aureus* 209P) и грамотрицательный (*Escherichia coli* 113-13) бактерий согласно методике, описанной в статье (Игидбашян и соавт., 2014). В застывшем мясопеп-

тонном агаре, содержащем взвесь клеток суточной бактериальной тест-культуры (10^8 кл. в 1 мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича), делали шесть лунок диаметром 7 мм по окружности чашки Петри на расстоянии 30–33 мм от центра. В три лунки (через одну) вносили по 0.1 мл антибактериального средства с установленной активностью (стандарта), в три другие лунки – по 0.1 мл водных растворов *L*- и *D*-изоформ AscA или растворов CS·HCl в *L*-AscA и *D*-AscA, взятых в разведениях 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8. В качестве стандарта использовали 0.05%-ный водный раствор хлоргексидинабиглюконата (ООО “Южфарм”, Россия), применяющегося в медицине в качестве асептического средства. Зоны задержки роста бактерий измеряли через 18–20 ч культивирования. О наличии линейной зависимости между диаметром зон подавления роста и логарифмом дозы препарата судили по значению коэффициента корреляции r . Эксперимент повторяли троекратно.

Морфологию и ультраструктуру бактериальных клеток, выращенных в мясопептонном бульоне (МПБ) в отсутствие (контроль) или в присутствии испытуемых препаратов, изучали на просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (“CarlZeiss”, Германия) на базе ЦКП “Симбиоз” ИБФРМ РАН. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме ULTRACUT UCT (“Reichert”, Австрия). Целые клетки и их срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры “Jeol” (Япония) и цифровой камеры бокового ввода “Veleta SIS” (Германия).

Все вычисления и статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel (пакет ПО Microsoft Office 2010) и StatSoft Statistica v6.0 Rus (2006). Критический уровень значимости был принят $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование оптической активности индивидуальных изомеров AscA показало, что водные растворы *L*-AscA и *D*-AscA характеризуются противоположными по знаку значениями удельного оптического вращения $[\alpha]$ и разным типом кривых ДОВ (рис.1, кривые 1 и 2). Раствор *L*-AscA показывает правое вращение и аномальную дисперсию, поскольку на зависимости $[\alpha] = f(\lambda)$ имеется перегиб. Значения $+\alpha$ в исследуемом диапазоне длины волны изменяются не монотонно: в диапазоне $\lambda = 280\text{--}365$ нм возрастают с увеличением длины волны, а при $\lambda = 405\text{--}710$ нм – уменьшаются. Такое поведение согласуется с УФ-спектром водного раствора *L*-AscA, на котором присутствует интенсивный максимум при 265 нм и небольшая полоса поглощения между

350–400 нм. Раствор *D*-AscA показывает левое вращение и нормальную дисперсию: значения $-\alpha$ монотонно убывают по модулю с увеличением λ . Обращает внимание, что при $\lambda \sim 405$ –710 нм растворы *L*-AscA и *D*-AscA имеют близкие по модулю значения $[\alpha]$, а при $\lambda = 280$ –365 нм модуль $[\alpha]$ раствора *D*-AscA существенно выше модуля этой величины для раствора *L*-AscA.

Водные растворы CS · HCl в *L*-AscA и *D*-AscA, т.е. гидрохлорида-*L*-аскорбата (CS · HCl · *L*-AscA) и гидрохлорида-*D*-аскорбата хитозана (CS · HCl · *D*-AscA), как и растворы *L*-AscA и *D*-AscA, характеризуются противоположным направлением вращения плоскости поляризации – правым и левым соответственно, и различным характером кривых дисперсии (рис. 1, кривые 3 и 4). Однако оптическая активность солей AscA с CS · HCl несколько отличается от оптических свойств *L*- и *D*-изоформ AscA. Так, дисперсионная кривая раствора CS · HCl · *L*-AscA, как и раствора *L*-AscA, хоть и относится к аномальному типу, однако показывает не только перегиб на зависимости $[\alpha] = f(\lambda)$, но и инверсию знака вращения при $\lambda \sim 380$ нм. Уместно отметить, что для раствора CS · HCl · *L*-AscA наблюдается bathochromный сдвиг полосы поглощения в УФ-спектре по сравнению с раствором *L*-AscA. Кривая ДОВ раствора CS · HCl · *D*-AscA, как и раствора *D*-AscA, плавная, но реализуемые значения $-\alpha$ несколько меньше по абсолютной величине. Как и в случае водных растворов изомеров AscA, растворы CS · HCl · *L*-AscA и CS · HCl · *D*-AscA показывают в определенном диапазоне длин волн ($\lambda \sim 495$ –710 нм) близкие по модулю значения удельного оптического вращения.

Проведенное микробиологическое исследование выявило различия в антимикробной активности растворов изомерных форм AscA и их солей с CS · HCl. В частности, из рис. 2 видно, что диаметр зон угнетения роста кишечной палочки у тестируемых растворов существенно различается. Наибольшие зоны просветления (18.80 ± 0.05 мм) формируются при внесении в лунки раствора соли CS · HCl · *D*-AscA в разведении 1 : 2 (рис. 2г, 1), наименьшие (9.6 ± 0.07 мм) – раствора индивидуального изомера *D*-AscA в разведении 1 : 8 (рис. 2б, 3). При этом биоцидное действие всех тестируемых препаратов значительно уступает стандарту – 0.05%-ному раствору хлоргексидина-биглюконата, вызывающему образование зон угнетения роста диаметром 20.00 ± 0.01 мм.

Значения антибактериальной активности (A_i) растворов в отношении *S. aureus* 209P и *E. coli* 113-13, рассчитанной по алгоритму (Шиповская, Зудина и соавт., 2015) и выраженной в единицах опорной концентрации стандарта, приведены в таблице.

Сравнение значений A_i для индивидуальных изомеров AscA показывает, что биоцидная активность раствора *L*-AscA по сравнению раствором

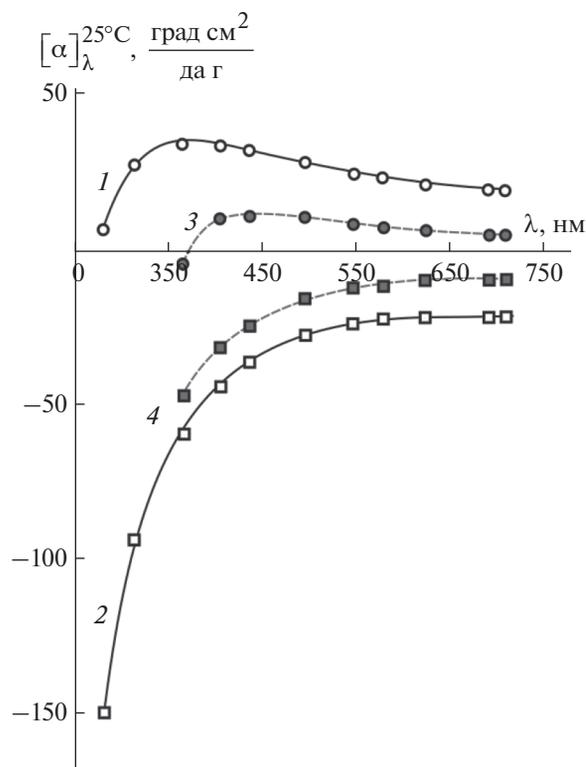


Рис. 1. Кривые ДОВ водных растворов *L*- и *D*-аскорбиновой кислоты (1, 2), гидрохлорида-*L*-аскорбата (3) и гидрохлорида-*D*-аскорбата хитозана (4), полученных при мольном соотношении CS · HCl : AscA = 1 : 0.6.

D-AscA значимо выше как в отношении штамма *E. coli* 113-13 (в 1.9 раза, $p \leq 0.05$), так и в отношении *S. aureus* 209P (в 2.1 раза, $p \leq 0.05$).

Иная картина наблюдается при воздействии на культуры бактерий растворов солей CS · HCl · *L*-AscA и CS · HCl · *D*-AscA. Оказалось, что раствор CS · HCl · *L*-AscA, по сравнению с раствором CS · HCl · *D*-AscA, в 3.2 раза менее активен в отношении культуры *S. aureus* 209P ($p \leq 0.05$) и в 7.5 раза – в отношении *E. coli* 113-13 ($p \leq 0.05$).

При сравнении антибактериальной активности индивидуальных изомеров AscA и их солей с хитозаном установлено, что величина A_i для *D*-AscA статистически значимо ниже, чем для CS · HCl · *D*-AscA: в отношении *S. aureus* 209P – в 1.7 раза, в отношении *E. coli* 113-13 – в 2.2 раза. В то же время, значения A_i для *L*-AscA существенно выше таковых для CS · HCl · *L*-AscA: в 6.3 раза ($p \leq 0.05$) в отношении *E. coli* 113-13 и в 4.0 раза ($p \leq 0.05$) в отношении *S. aureus* 209P.

Значения антибактериальной активности в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* 113-13 для растворов *L*-AscA и *D*-AscA были в 1.3 раза ($p \geq 0.05$) и в 1.5 раза ($p \leq 0.05$) выше, соответственно, чем таковые в отношении грамположи-

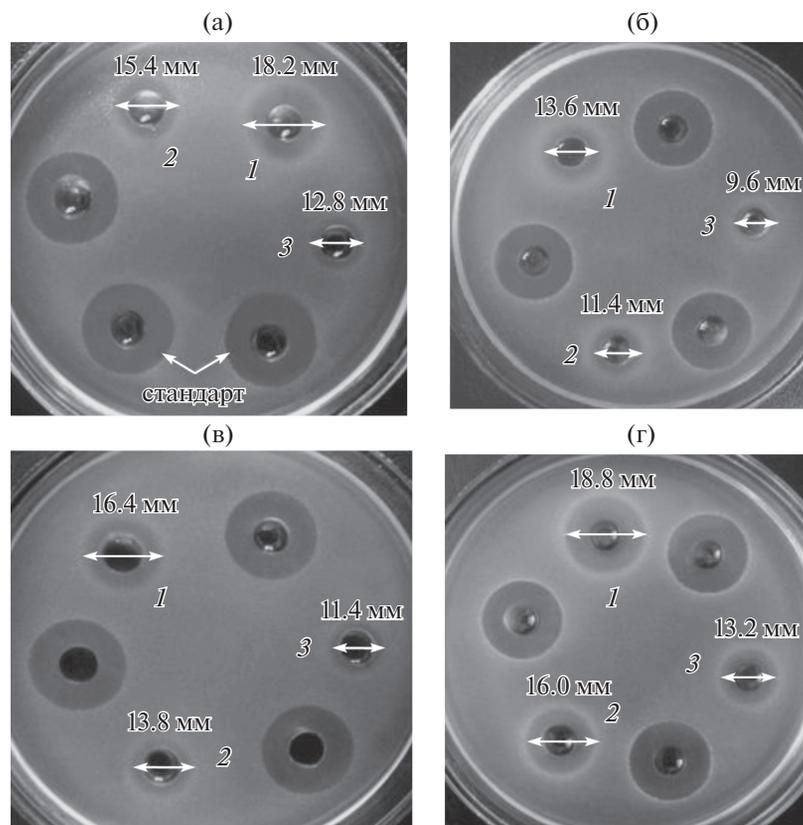


Рис. 2. Зоны угнетения роста культуры *E. coli* 113-13 водными растворами *L*-AscA (а), *D*-AscA (б), CS · HCl · *L*-AscA (в), CS · HCl · *D*-AscA (г) в разведениях 1 : 2 (1), 1 : 4 (2), 1 : 8 (3) и 0.05%-ным раствором хлорексидинабиглюконата (стандарт).

тельной бактерии *S. aureus* 209P. Статистически значимых различий в чувствительности к биоцидному действию растворов CS · HCl · *L*-AscA у тестируемых культур установлено не было. Отношение значений A_p , рассчитанных для *S. aureus* 209P и *E. coli* 113-13, для этой полисоли составило 1.3 ($p \geq 0.05$). В то же время, к действию растворов CS · HCl · *D*-AscA клетки штамма *E. coli* 113-13 проявляли большую чувствительность по сравнению с *S. aureus* 209P – в 1.9 раза ($p \leq 0.05$).

Таким образом, установлено, что *L*-стереоформа AscA существенно превосходит *D*-AscA по способности ингибировать рост грамположительных и грамотрицательных бактерий. Однако растворы ее соли с хитозаном CS · HCl · *L*-AscA подавляли рост бактерий в более высоких концентрациях, чем растворы CS · HCl · *D*-AscA.

Полученные результаты просвечивающей электронной микроскопии клеток тестерных бактерий подтвердили сведения других авторов о том, что хитозан в солевой форме способен нарушать целостность клеточной стенки бактерий и вызывать фатальную потерю внутриклеточного содержимого (Фассахов и соавт., 2009; Chung et al., 2004). На электронных фотографиях встречались множе-

ственные остатки лизированных клеток, клеточная стенка бактерий местами плохо контурировалась или была полностью размыта, отмечалось наличие осмиофильного вещества, которое, по всей видимости, являлось продуктом утечки содержимого клеток (рис. 3).

Установлено также, что воздействие полисоли CS · HCl · *D*-AscA на клетки бактерий *S. aureus* 209P и *E. coli* 113-13 вызывает более глубокие деструктивные изменения клеточных структур, чем воздействие CS · HCl · *L*-AscA. В частности, в клеточных стенках бактерий, выращенных в присутствии полисоли CS · HCl · *L*-AscA, выявлялись многочисленные участки с нарушением целостности, размер которых у *E. coli* 113-13 варьировал от 150 до 350 нм, у *S. aureus* 209P – от 25 до 170 нм. При воздействии CS · HCl · *D*-AscA на клетки бактерий размер повреждений клеточных стенок *E. coli* 113-13 колебался от 200 до 600 нм, у *S. aureus* 209P – от 90 до 250 нм.

Согласно имеющимся литературным данным, для растворов хитозана в органических и неорганических кислотах (CH₃COOH, HCl), ацетатном буфере (0.33 M CH₃COOH + 0.2 M CH₃COONa) реализуются плавные кривые ДОВ, лежащие в

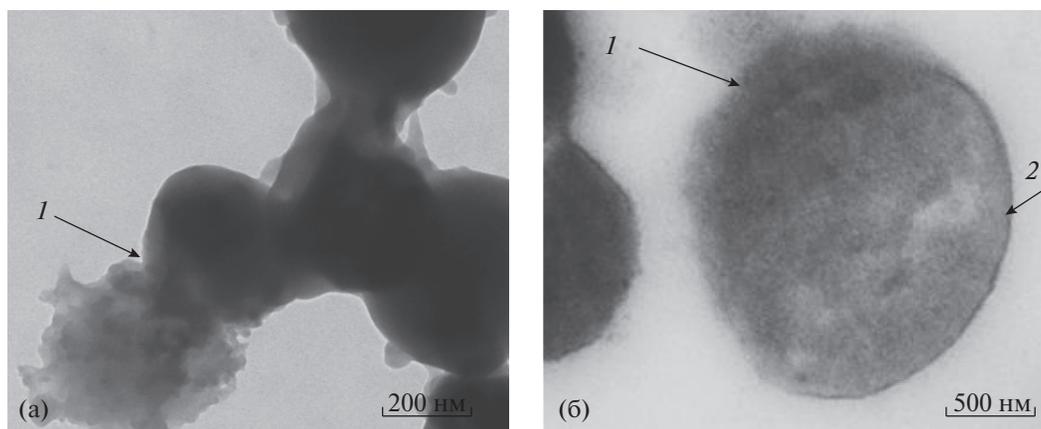


Рис. 3. Негативное контрастирование (а) и ультратонкий срез (б) клеток *S. aureus* 209P после воздействия CS · HCl · D-AscA: 1 – поврежденный участок клеточной стенки с выходом цитоплазматического содержимого наружу; 2 – интактная клеточная стенка.

области отрицательных значений удельного оптического вращения (Шиповская и соавт., 2007; Koralewski et al., 2006; Шиповская и соавт., 2015). Положительные же значения $[\alpha]$ характерны для растворов олигомеров хитозана с числом элементарных звеньев ≤ 4 и для мономера N-глюкозамина (Шиповская и соавт., 2007). Немонотонные (аномального типа) дисперсионные кривые с положительным знаком $[\alpha]$ позволяют предположить, что взаимодействие CS · HCl с L-AscA в водном растворе пространственно отличается как от взаимодействия с D-AscA, так и с другими органическими и неорганическими кислотами. Возможно, именно этим объясняется разная антибактериальная активность как индивидуальных изомеров AscA, так и их солей с CS · HCl. По всей видимости, стерические особенности органического лиганда являются критическими для установления полноценного взаимодействия протонированных аминогрупп хитозана с сайтами связывания на поверхности клеточных мембран.

Таблица 1. Значения антибактериальной активности растворов L- и D-изомеров аскорбиновой кислоты и ее солей с гидрохлоридом хитозана, рассчитанные относительно 0.05%-ного раствора хлоргексидина, $r_i^2 = 0.99$

Раствор	Антибактериальная активность (A_i), %	
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	<i>Escherichia coli</i> 113-13
L-AscA	36.4	45.7
D-AscA	17.0	24.6
CS · HCl · L-AscA	9.2	7.3
CS · HCl · D-AscA	29.2	54.7

В данной работе нами зарегистрирована корреляция антибактериальной активности соли аскорбата хитозана с величиной и знаком удельного оптического вращения его растворов, что дополняет результаты работ (Шиповская и соавт., 2008; Shipovskaya et al., 2013; Шиповская и соавт., 2017), показавшие зависимость бактерицидных свойств олигомеров хитозана (0.68–16.5 кДа), растворов и пленок ацетата хитозана (50–700 кДа) от молекулярной массы образца, модификации полимера и степени его дегидратации. Указанные физико-химические параметры определяют величину и знак удельного оптического вращения используемых препаратов. Оказалось, что независимо от данных параметров, наибольшее бактерицидное действие оказывали образцы олигомеров хитозана и ацетата хитозана, имеющие наименьшие по модулю отрицательные значения $[\alpha]$ (Шиповская и соавт., 2008; Шиповская и соавт., 2017). Поэтому при конструировании биоцидных препаратов на основе хитозана следует учитывать, что взаимосвязь его биологического действия и оптической активности наблюдается не только при варьировании количества звеньев хитоолигомеров или фазового состояния (раствор, пленка), но и изоформы кислотного остатка полисоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 17-73-10076 “Хиральные полимерные матрицы: физико-химические свойства, взаимодействие с биообъектами”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Большаков И.Н., Еремеев А.В., Черданцев Д.В., Каскаев А.В., Кириченко А.К., Власов А.А., Сапожников А.Н. Биодegradуемые раневые покрытия на основе полисахаридных полимеров в лечении обширной ожоговой травмы (клиническое исследование) // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. Пластическая хирургия. 2011. Т. 38. № 3. С. 56–62.

- Булкина Н.В., Иванов П.В., Ведяева А.П., Токмакова Е.В., Попкова О.В. Опыт применения солей хитозана в комплексной терапии генерализованного пародонтита // Фарматека. 2015. № 2. С. 43–47.
- Игидбашиян В.М., Зудина И.В., Булкина Н.В., Китаева В.Н., Сирицина В.С. Применение математического подхода при оценке антибактериальной активности серебро-содержащих препаратов // Совр. проблемы науки и образования. 2014. № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14655>.
- Куликов С.Н. Природные поликатионы как средство повышения эффективности антибактериальных белков // Вестн. Казанского техн. ун-та. 2014. Т. 17. № 23. С. 224–226.
- Куликов С.Н., Хайруллин Р.З., Варламов В.П. Влияние поликатионов на антибактериальную активность лизостафина // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 6. С. 610–615. Kulikov S.N., Khairullin R.Z., Varlatov V.P. Influence of polycations on antibacterial activity of lysostaphin // Appl. biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 683–687.
- Фассахов Р.С., Варламов В.П., Тюрин Ю.А., Куликов С.Н. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2009. № 5. С. 91–97.
- Шиповская А.Б., Зудина И.В., Фомина В.И., Малинкина О.Н. Новые антимикробные препараты на основе комплексных солей хитозана с хиральным органическим лигандом // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 41. № 3. С. 82–94.
- Шиповская А.Б., Малинкина О.Н., Фомина В.И., Руденко Д.А., Шеголев С.Ю. Оптическая активность растворов и пленок ацетата хитозана // Изв. Академии наук. Сер. хим. 2015. № 5. С. 1172–1177.
- Shipovskaya A.B., Malinkina O.N., Fomina V.I., Rudenko D.A., Shchegolev S.Y. Optical activity of solutions and films of chitosan acetate // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1172–1177.
- Шиповская А.Б., Фомина В.И., Казмичева О.Ф., Руденко Д.А., Малинкина О.Н. Оптическая активность пленок хитозана разной молекулярной массы и модификации // Высокомолек. соед. 2017. Т. 59А. № 3. С. 250–261.
- Шиповская А.Б., Фомина В.И., Казмичева О.Ф., Тимофеева Г.Н., Комаров Б.А. Влияние молекулярной массы на оптическую активность хитозана // Высокомолек. соед. 2007. Т. 49Б. № 12. С. 2195–2199.
- Шиповская А.Б., Фомина В.И., Киреев М.Н., Казакова Е.С., Касьян И.А. Биологическая активность олигомеров хитозана // Изв. Саратовск. ун-та. Сер. химия, биология, экология. 2008. Т. 8. № 2. С. 46–49.
- Chung Y.C., Su Y.P., Chen C.C., Jia G., Wang H.L., Wu J.C.G., Lin J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall // Acta Pharmacol. Sinica. 2004. V. 25. P. 932–936.
- Koralewski M., Bodek K.H., Marczewska K. Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives / Ed. Małgorzata M. Jaworska. Lodz.: Polish Chitin Soc., 2006. P. 29–39.
- Raafat D., Leib N., Wilmes M., François P., Schrenzel J., Sahl H.G. Development of *in vitro* resistance to chitosan is related to changes in cell envelope structure of *Staphylococcus aureus* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 157. P. 146–155.
- Shipovskaya A.B., Fomina V.I., Rudenko D.A., Shchyogolev S.Yu. Influence of physical and chemical modification on the optical rotatory dispersion and biological activity of chitosan films // Int. J. Polym. Sci. 2013. Article ID: 825296. 6 p. doi 10.1155/2013/825296

Effect of Ascorbic Acid Isomeric Forms on Antibacterial Activity of Its Chitosan Salts

N. O. Gegel¹, *, I. V. Zudina², O. N. Malinkina², and A. B. Shipovskaya²

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia*

²*Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, Russia*

*e-mail: gegelno@yandex.ru

Received March 21, 2018

Abstract—Optical rotatory dispersion studies revealed water solutions of chitosan in L- and D-ascorbic acid to exhibit right rotation with anomalous dispersion and left rotation with normal dispersion, respectively. Microbiological investigation and transmission electron microscopy revealed the chitosan salt with D-ascorbic acid to cause deeper destructive changes than pure chitosan, which resulted in higher antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* 209P and *Escherichia coli* 113-13.

Keywords: chitosan, ascorbic acid, stereoisomerism, antibacterial activity

ДЕЙСТВИЕ ХИТОЗАНА НА РАЗВИТИЕ МИКРОСПОРИДИЙ *NOSEMA APIS* В МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛАХ

© 2018 г. Е. С. Салтыкова^а, *, Л. Р. Гайфуллина^а, М. Д. Каскинова^а, А. Р. Гатауллин^а,
Р. Т. Матниязов^а, А. В. Поскряков^а, А. Г. Николенко^а

^аИнститут биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

*e-mail: saltykova-e@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2018 г.

Исследовано действие хитозана (200 кДа, 75% деацетилирования) на развитие *Nosema apis* в пчелиных семьях в процессе зимовки. Проанализированы условия развития нозематозной инфекции. Хитозан значительно снижал степень зараженности особей спорами *N. apis* по результатам определения специфичных для *N. apis* ПЦР-продуктов. Обсуждается схема стимуляции хитозаном иммунной системы пчел через изменения в уровне антимикробных пептидов и белков антиоксидантных систем организма. Благодаря снижению степени зараженности ноземой увеличивалась выживаемость пчел в течение длительного зимнего периода.

Ключевые слова: хитозан, *Nosema apis*, *Apis mellifera*, иммунитет насекомых

DOI: 10.1134/S0026365618050154

Nosema spp. — родственные грибам простейшие отдела микроспоридий (*Microsporidia*), являющиеся внутриклеточными паразитами представителей *Apis* spp. Виды *N. apis* и *N. ceranae* вызывают у медоносной пчелы нозематоз — опасное заболевание, широко распространенное во всем мире и вызывающее массовую гибель пчел и пчелиных семей на пасеках. *Nosema* spp. образует стрессоустойчивые споры, которые прорастают в клетках эпителия средней кишки хозяина, где затем размножаются, совершая цикл развития. Новые споры могут поражать ту же особь или распространяться в окружающую среду через пчелиные экскременты. Обладая только остаточными митохондриальными органеллами, микроспоридии поглощают АТФ из клеточной среды хозяина, вызывая у них энергетический и окислительный стресс, дегенерацию кишечника и предотвращая обновление эпителиальной ткани (Alaux et al., 2010; Dussauba et al., 2012). Пчелы способны противодействовать нозематозной инфекции за счет увеличения объема питания для возмещения повышенных энергетических затрат (Mauck, Naug, 2010). Это обстоятельство обуславливает высокий уровень смертности в пчелиных семьях, пораженных нозематозом, в условиях продолжительного зимнего периода и ограниченных кормовых ресурсов. В данном случае на первый план в борьбе с инфекцией выходит иммунная система. Ранее нами было показано, что хитозан стимулирует защитные системы организма медоносной пчелы, а также обладает выраженным фунги-

статическим действием в отношении *Ascospaera apis* (Салтыкова и соавт., 2016). Иницируя триггерные механизмы иммунной системы пчел, хитозан участвует в регуляции ее защитных реакций. Как вещество природного происхождения, он полностью перерабатывается пчелой и не накапливается в продуктах пчеловодства, обладая, таким образом, полной безопасностью и экологичностью.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы было оценить действие хитозана на развитие *N. apis* в пчелиных семьях в процессе зимовки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования была *Nosema apis*, которую определяли в кишечнике медоносных пчел. От одной исходной пчелиной семьи методом отводков были получены четыре семьи равные по силе (примерно 26 кг, 6 улочек) для работы с генетически однородным материалом. Все семьи были носителями *N. apis*. Две семьи были подкормлены осенью 60% сахарным сиропом, содержащим 0.01% хитозан (200 кДа, 75% деацетилирования), предоставленный ЗАО “Биопрогресс” (Россия). Две семьи контрольного варианта осенью получили 60%-ый сахарный сироп без добавок. В начале эксперимента (октябрь) и после облета пчел весной (апрель) производили ПЦР-диагностику *Nosema apis*. В течение осенне-зимне-весеннего периода регистрировали: (1) количество спор *N. apis* в кишечнике рабочих пчел,

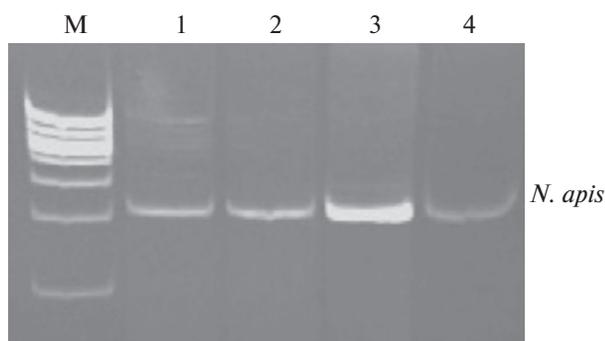


Рис. 1. ПЦР-продукты, специфичные для ДНК *N. apis*, в кишечнике рабочих пчел: 1 – без хитозана, октябрь, 2 – с хитозаном, октябрь, 3 – без хитозана, апрель, 4 – с хитозаном, апрель, М – маркеры.

(2) оценку состояния кишечника, (3) величины активности фенолоксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы в кишечнике и (4) уровень экспрессии генов вителлогенина и абецина в жировом теле рабочих пчел.

Выделение ДНК из клеток *N. apis* (из брюшка одной пчелы) проводили набором ДНК-ЭКСТРАН-2 (“Синтол”, Россия). Амплификация была выполнена в термоциклере BIO-RAD T100 (США) в 20 мкл общего объема смеси ПЦР, состоящей из: 17 мкл дистиллированной воды, 2 мкл магниевого буфера, DNTP 10 мкМ 0.4 мкл, по 0.6 мкл F-прайма и R-прайма (2 ОЕ), 0.3 мкл *Taq*-полимеразы, с использованием пары праймеров F-GCATGTCTTTGACGТАСТАТGТА и R-CGTTTAAAATGTGAAACAАСТАТG (Martin-Hernandez et al., 2007). Продукты амплификации разделяли в 8% ПААГ при силе тока 40 мА, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в гель-документирующей системе DocPrint (“Vilber Lourmat”, Франция). Из каждой семьи было диагностировано по 10 пчел.

Для определения уровня экспрессии генов вителлогенина и абецина из жирового тела 20 пчел выделяли РНК набором РНК-ЭКСТРАН (“Синтол”, Россия). Из суммарной РНК получали кДНК, используя набор реагентов для проведения обратной транскрипции (“Синтол”, Россия). ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, США) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Реакционные смеси содержали пары праймеров: для гена абецина – F-CAGCATTCGCATACGTACCA и R-GACCAG-GAAACGTTGGAAAC (Evans, Lopes, 2004), вителлогенина – F-CCGACGAGGACCTGTGATTA и R-CTAGGATACGTGGTCAТGACA (Koyuwattrakul et al., 2005) и митохондриальной глутатион-S-трансферазы (*mgst*) – F-TTGCTCTG-TAAGGTTGTTTTGC и R-TGTCTGGTТААСТА-

СААТСТТСТG) (Gregory et al., 2005). Уровень экспрессии генов абецина и вителлогенина выравнивали по гену “домашнего хозяйства” *mgst*.

Для определения активности ферментов кишечника освобождали от содержимого промыванием дистиллированной водой и гомогенизировали в охлажденном до 5°C в 0.05 М *трис*-НС1 буфере, рН 7.6, содержащем 1 мМ дитиотрейтола и 0.05 мл/л тритона X-100. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 3°C и 12 000 об./мин на центрифуге К-24 (“Janetzki”, Германия). В супернатанте определяли активность ферментов спектрофотометрически (“Shimadzu UV-1800”, Япония): активность супероксиддисмутазы (СОД) (ЕС 1.15.1.1) – по восстановлению нитросинего тетразолия (Чевари и соавт., 1985), каталазы (ЕС 1.11.1.6) – по скорости разложения перекиси водорода (Королюк и соавт., 1986), фенолоксидазы (ЕС 1.10.3.1) – по скорости окисления L-ДОФА (Раушенбах, 1987). Удельную активность ферментов выражали в ед. активности/мг белка. Содержание белка определяли по методу Бредфорд (Скоупс, 1985), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Измерения выполняли в трех биологических и аналитических повторностях.

Количество спор *N. apis* учитывали индивидуально в кишечнике 10 пчел из каждой семьи. Кишечник каждой пчелы растирали с 1 мл дистиллированной воды, каплю полученной суспензии микроскопировали при увеличении ×800 на микроскопе “Carl Zeiss Jena” (Германия), для подсчета клеток использовали счетную камеру Горяева.

Состояние кишечного тракта пчел оценивали у 10 пчел из каждой семьи по 4-балльной системе (Сердюченко, 2003).

Данные представлены в виде среднеарифметических значений. Их достоверность определяли по *t*-критерию Стьюдента, пользуясь программой Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кишечнике рабочих пчел всех экспериментальных семей перед постановкой в зимовку и после весеннего облета были обнаружены ПЦР-продукты специфичные для ДНК *N. apis* (рис. 1). После весеннего облета в варианте без хитозана регистрировалось увеличение количества ПЦР-продуктов в сравнении с обработанными хитозаном пчелами, что свидетельствовало о большей обсемененности кишечника спорами ноземы.

Перед постановкой ульев в зиму количество спор *N. apis* в кишечнике пчел всех семей соответствовало низкой степени поражения и не отражалось на состоянии кишечника (табл. 1, 2), последнее оценивалось на 3–4 балла. Кишечник извлекался из пчел полностью, обладал упругой

Таблица 1. Количество спор *N. apis* в кишечнике рабочих пчел, 10^6 кл./мл

Вариант	Октябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март	Апрель
Контроль	1.3 ± 0.4	12.8 ± 0.8	35.6 ± 3.2	46.6 ± 4.4	52.8 ± 4.2	65.8 ± 7.8
Хитозан	1.4 ± 0.5	4.4 ± 1.2	7.6 ± 1.4	10.5 ± 2.5	12.4 ± 2.6	16.3 ± 3.7

Таблица 2. Состояние кишечника рабочих пчел, балл

Вариант	Октябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март	Апрель
Контроль	3.6 ± 0.5	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2
Хитозан	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.5	3.6 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.2 ± 0.4	3.0 ± 0.0

стенкой, был заполнен сформированными плотными или слабо растекающимися экскрементами (табл. 2). В течение зимнего периода увеличивалась степень поражения пчел ноземой (табл. 1). Пик инфекции наблюдался в апреле. Результатом осенней обработки пчелиной семьи хитозаном явилось значительное снижение количества спор паразита в кишечнике пчел в период зимовки и к моменту облета (рис. 2). С развитием инфекции в ходе зимовки состояние кишечника пчел ухудшалось (табл. 2): после весеннего облета кишечная стенка представляла собой легко разрывающуюся тонкую оболочку, заполненную жидким хлопьевидным или однородным содержимым. Осенняя обработка пчел хитозаном позволяла избежать развития серьезной патологии пищеварительного тракта.

Уровень экспрессии гена вителлогенина и абецина в жировом теле пчел в начале эксперимента

значимо не различался у особей всех семей в силу их генетической однородности. На фоне развития нозематоза в ходе зимовки пчел регистрировалось постепенное повышение уровня экспрессии гена вителлогенина и понижение уровня экспрессии гена абецина (рис. 3). Результатом осенней подкормки пчел хитозаном явилось 2–3-кратное повышение данных показателей относительно показателей необработанных пчел.

В целом, в ходе зимовки уровень активности фенолоксидазы и антиоксидантных ферментов в кишечнике пчел повышался во всех семьях (рис. 4). Пчелы в варианте без хитозана отличались интенсивным ростом активности СОД с февраля по апрель, при незначительной степени возрастания активности фенолоксидазы и каталазы. Результатом осенней подкормки пчел хитозаном явилось значительное повышение уровня активности всех исследованных ферментов.

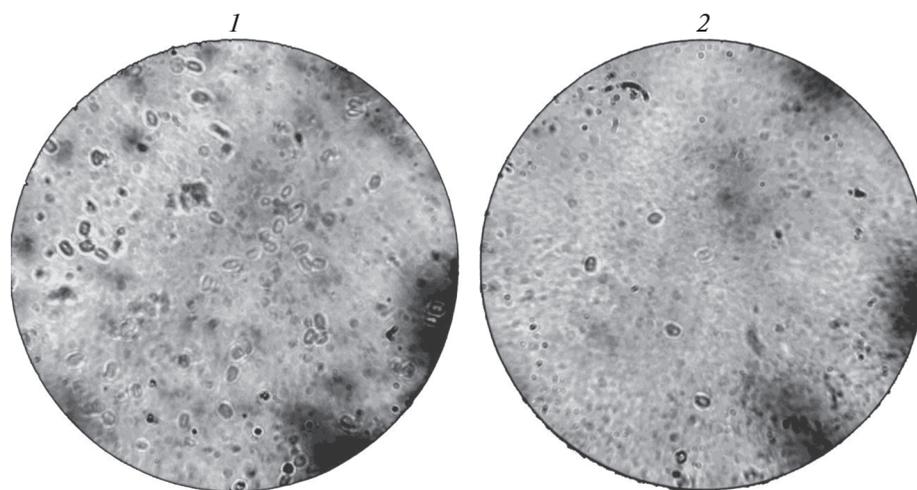


Рис. 2. Споры *N. apis* в кишечнике рабочих пчел после весеннего облета: 1 – без хитозана, 2 – при действии хитозана. Микроскопия в фазовом контрасте, $\times 800$.

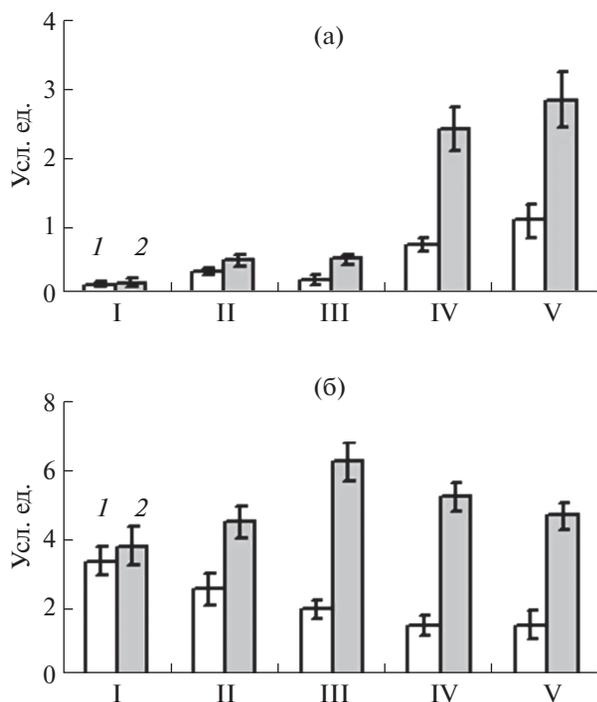


Рис. 3. Уровень экспрессии генов вителлогенина (а) и абецина (б) в жировом теле медоносной пчелы (после выравнивания по хаускипенговому гену *mgst*) на фоне развития инфекции *N. apis* в зимне-весенний период: 1 – без хитозана, 2 – при действии хитозана (I – октябрь, II – декабрь, III – февраль, IV – март, V – апрель).

В целом, весенняя ревизия пчел показала, что семьи в отсутствие хитозановой обработки были ослаблены зимовкой. По количеству подмора на дне улья обнаруживалась высокая гибель рабочих пчел с выраженными признаками нозематоза (резкий запах, раздутое брюшко, высокая степень опоношенности), чего не наблюдали в семьях, обработанных осенью хитозаном.

Кишечник медоносной пчелы во многом определяет устойчивость к болезням на уровне особи и колонии в целом. Защитная функция кишечной стенки реализуется активной реакцией – изменением тонуса мышц, реакцией эпителия и перитрофической мембраны, изменением рН внутренней среды и активности ферментов (Салтыкова и соавт., 2005). Отсутствие опорожнения толстой кишки и накопление в нем патогенной и условно-патогенной микрофлоры повышает риск развития у пчел в зимний период того или иного инфекционного заболевания, что обуславливает необходимость повышения уровня активности феноксидазы и каталазы. Кроме того, в период зимовки в кишечнике пчелы накапливается от 20 до 70 мг неусвоенных остатков пищи. В этой ситуации баланс в системе активные формы

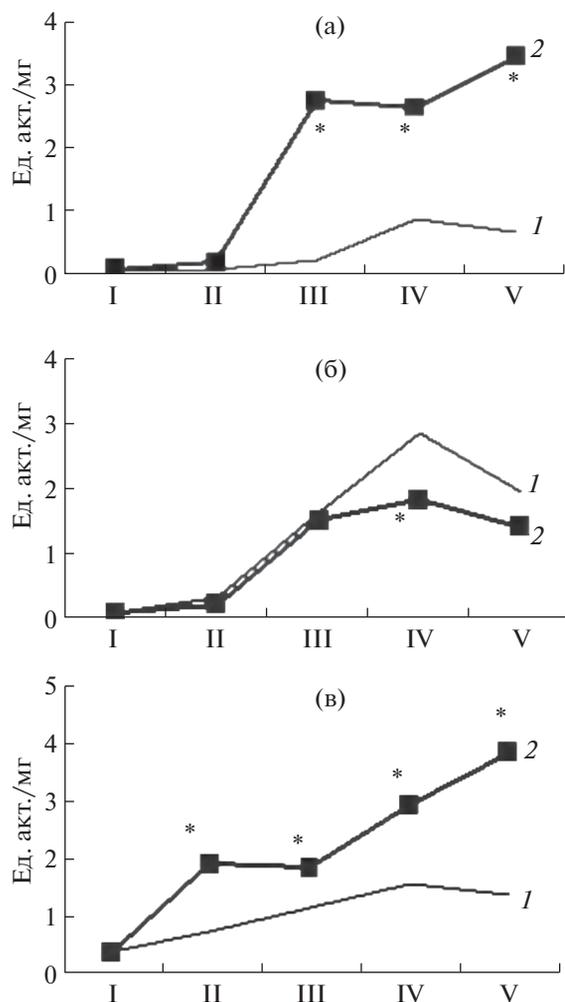


Рис. 4. Динамика активности феноксидазы (а), супероксиддисмутазы (б) и каталазы (в) в кишечнике медоносной пчелы на фоне развития инфекции *N. apis* в зимне-весенний период: 1 – без хитозана, 2 – после действия хитозана (I – октябрь, II – декабрь, III – февраль, IV – март, V – апрель). * – различие вариантов достоверно при $P \leq 0.1$.

кислорода (АФК) / антиоксиданты особенно важен для нейтрализации гнилостных процессов и феноксидазогенерируемой цитотоксичности в кишечнике, что обеспечивает выживание колонии. В отсутствие подкормки пчел хитозаном нами регистрировалась повышенная активность СОД, приводящая на фоне пониженной активности каталазы к накоплению перекиси водорода. При повышенной каловой нагрузке и развивающемся окислительном стрессе в зимний период существует большая опасность ослабления пчелиных семей и развития нозематозной инфекции.

Было показано, что иммунная система медоносной пчелы быстро активируется при попада-

нии в организм спор ноземы, что выражается на начальном этапе повышением уровня экспрессии иммунных генов, кодирующих рецепторы Toll-, IMD-, JNK- и JAK/STAT путей (Antunez et al., 2009; Huang et al., 2012). С развитием инфекции у пчел из семей, селектированных по иммунной толерантности к *N. apis*, экспрессия иммунных генов остается на высоком уровне, тогда как в неселектированных семьях наблюдается депрессия иммунной системы и высокая смертность. Соответственно, стимуляция иммунитета хитозаном может аналогичным образом повысить устойчивость пчел к нозематозу и сократить применение антибиотиков на пасеке.

Изменения в уровне экспрессии генов вителлогенина и абецина, а также активности ферментов фенолоксидазной и антиоксидантной систем демонстрируют усиление гуморальной защиты пчел в результате действия хитозана. Фенолоксидазная система выступает в качестве интегрального звена иммунных реакций насекомых, участвуя практически во всех клеточных и гуморальных иммунных реакциях (Гайфуллина и соавт., 2006), и функционально связана с антиоксидантной системой, снижающей окислительное повреждение собственных клеток и тканей (Глулов и соавт., 2009). Абецин – богатый пролином длинноцепочечный незамещенный пептид, специфичный для *Hymenoptera* и обладающий бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (Rahnamaeian et al., 2015). Уровень данного пептида возрастает как при проникновении в организм пчел различных патогенов, так и при действии хитозана, что может служить критерием иммунокомпетентности отдельных пчелиных семей (Evans, Lopes, 2004; Салтыкова и соавт., 2016). Вителлогенин – белок, выполняющий в организме медоносной пчелы множество функций, в том числе антиоксидантные и иммунные. Непосредственные антиоксидантные функции вителлогенина в организме медоносной пчелы обусловлены его Zn-связывающей способностью и преимущественным окислительным карбонилированием при оксидативном стрессе пчел (Amdam et al., 2004; Seehuus et al., 2006). Иммуногистохимия пчелиных тканей и вестерн-блоттинг показывают, что вителлогенин связывается с клетками и мембранными структурами здоровых тканей и обеспечивает непосредственную защиту клеток от атаки АФК (Havukainen et al., 2013). Предполагается, что распознавание клеточных повреждений и защитное окисление – два механизма, которые позволяют вителлогенину продлить срок жизни медоносной пчелы. Помимо антиоксидантной защиты известно участие

вителлогенина в иммунологическом распознавании (Zhang et al., 2011). Так, вителлогенин связывается с клетками бактерий различных видов: грамположительными *Paenibacillus larvae* и грамотрицательными *Escherichia coli*, а также с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (Salmela et al., 2015).

В целом, на основе полученных нами и литературных данных, механизм иммунного стимулирования пчел хитозаном можно представить следующим образом. Фенолоксидаза активируется хитозаном, что имитирует компоненты клеточной стенки микроорганизмов в ходе профенолоксидазного каскада, опосредуемого белками распознавания, сериновыми протеиназами и ингибиторами протеиназ. Процесс распознавания запускает сигнальную трансдукцию, контролирующую экспрессию антимикробных пептидов. В ходе профенолоксидазного каскада генерируются АФК и меланин, составляющие цитотоксический арсенал внутренней среды организма медоносной пчелы. Для снижения цитотоксического действия АФК активируются антиоксидантные ферменты. АФК, помимо прямого цитотоксического действия, выступают и в роли медиаторов сигнальной трансдукции, индуцирующих экспрессию генов антимикробных пептидов, в данном случае абецина.

Не исключено и прямое влияние хитозана на развитие *N. apis*. Ранее нами показано, что исследуемая молекулярная форма хитозана проявляет выраженную фунгистатическую активность в отношении другого грибного патогена медоносной пчелы – *Ascospaera apis* (Салтыкова и соавт., 2016). При воздействии хитозана на культуру *A. apis*, выделенную из больных личинок пчел, наблюдается значительное угнетение роста гриба, деформация гиф, нарушение формирования спороцист. Поскольку *N. apis* – внутриклеточный паразит, доказательство прямого действия хитозана в данном случае сопряжено с технологическими трудностями, связанными с разведением культуры кишечного эпителия медоносной пчелы.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что осенняя подкормка пчелиных семей хитозаном снижает обсемененность кишечника спорами ноземы, сохраняет барьерные функции пищеварительного тракта и стимулирует иммунные системы организма насекомых. В целом, результатом применения хитозана является повышение устойчивости пчелиных семей к нозематозу и снижение их гибели в процессе зимовки.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ государственной регистрации АААА-А16-116020350026-0) на оборудовании ЦКП “Биомика” отделения биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Николенко А.Г. Структура и механизмы гуморального иммунитета насекомых // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. № 6. С. 617–629.
- Глунов В.В., Слепнева И.А., Дубовский И.М. Генерация активированных кислородных метаболитов при формировании иммунного ответа у членистоногих // Труды Зоологического института РАН. 2009. Т. 313. № 3. 297–307.
- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.
- Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, генетический контроль, роль в адаптации // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1110–1118.
- Салтыкова Е.С., Беньковская Г.В., Гайфуллина Л.Р., Новицкая О.П., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Реакция отдельных физиологических барьеров при бактериальной инфекции у различных рас медоносной пчелы *Apis mellifera* // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2005. Т. 41. № 3. С. 254–258.
- Saltykova E.S., Benkovskaya G.V., Gaifullina L.R., Novitskaya O.P., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Reaction of individual physiological barriers in bacterial infection in different races of the honeybee, *Apis mellifera* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2005. V. 41. P. 318–324.
- Салтыкова Е.С., Каримова А.А., Гатауллин А.Р., Гайфуллина Л.Р., Матниязов Р.Т., Фролова М.А., Албулов А.И., Николенко А.Г. Влияние высокомолекулярных хитозанов на антиоксидантную и иммунную системы медоносной пчелы // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 5. С. 545–549.
- Saltykova E.S., Karimova A.A., Gataullin A.R., Gaifullina L.R., Matniyazov R.T., Frolova M.A., Albulov A.I., Nikolenko A.G. The effect of high-molecular weight chitosans on the antioxidant and immune systems of the honeybee // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 553–557.
- Сердюченко И.В. Микробиоценоз кишечного тракта медоносных пчел и его коррекция. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 04.07.2013. Краснодар: ФГБОУ ВПО Кубанский государственный аграрный университет, 2003. 19 с.
- Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Наука, 1985. 358 с.
- Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. № 11. С. 678–681.
- Alaux C., Brunet J.-L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L.P., LeConte Y. Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*) // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. P. 774–782.
- Amdam G.V., Simoes Z.L.P., Hagen A., Norberg K., Schrader K., Mikkelsen O., Kirkwood T.B.L., Omholt S.W. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees // Exp. Gerontol. 2004. V. 39. P. 767–773.
- Antunez K., Martin-Hernandez R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia) // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. P. 2284–2290.
- Dussaubat C., Brunet J.L., Hige M., Colbourne J.K., Lope J., Jeong-Hyeon C., Martin-Hernandez R., Botias C., Cousin M., McDonnell C., Bonnet M., Belzunces L.P., Moritz R.F.A., Le Conte Y., Alaux C. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera* // PLoS One. 2012. V. 7. e37017.
- Evans J.D., Lopes D.L. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) // J. Econ. Entomol. 2004. V. 97. P. 752–756.
- Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T., De Guzman L. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa mite* // J. Insect Sci. 2005. V. 5. № 3 P. 1–5.
- Havukainen H., Munch D., Baumann A., Zhong S., Halskau O., Krogsgaard M., Amdam G.V. Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 28369–28381.
- Huang Q., Kryger P., Le Conte Y., Moritz R.F.A. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections // J. Invertebr. Pathol. 2012. V. 109. P. 297–302.
- Koywiwattrakul P., Thompson G.J., Sittipraneed S., Oldroyd B.P., Maleszka R. Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees, *Apis mellifera* // J. Insect Sci. 2005. V. 5. № 5. P. 36–45.
- Martin-Hernandez R., Meana A., Prieto L., Salvador A.M., Garrido-Bailon E., Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 6331–6338.
- Mayack C., Naug D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers // J. Insect Physiol. 2010. V. 56. P. 1572–1575.
- Rahnamaeian M., Cytrynska M., Zdybicka-Barabas A., Dobslaff K., Wiesner J., Twyman R.M., Zuchner T., Sadd B.M., Regoes R.R., Schmid-Hempel P., Vilcinskas A. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria // Proc. Royal Soc. B. 2015. V. 282. P. 20150293.
- Salmela H., Amdam G.V., Freitak D. Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin // PLoS Pathogens. 2015. V. 11. № 7. e1005015.
- Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Kreckling T., Amdam G.V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 962–967.
- Zhang S., Wang S., Li H., Li L. Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011. V. 43. P. 303–305.

Effect of Chitosan on Development of *Nosema apis* Microsporidia in Honey Bees**E. S. Saltykova^{1,*}, L. R. Gaifullina¹, M. D. Kaskinova¹, A. R. Gataullin¹, R. T. Matniyazov¹,
A. V. Poskryakov¹, and A. G. Nikolenko¹**¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia***e-mail: saltykova-e@yandex.ru*

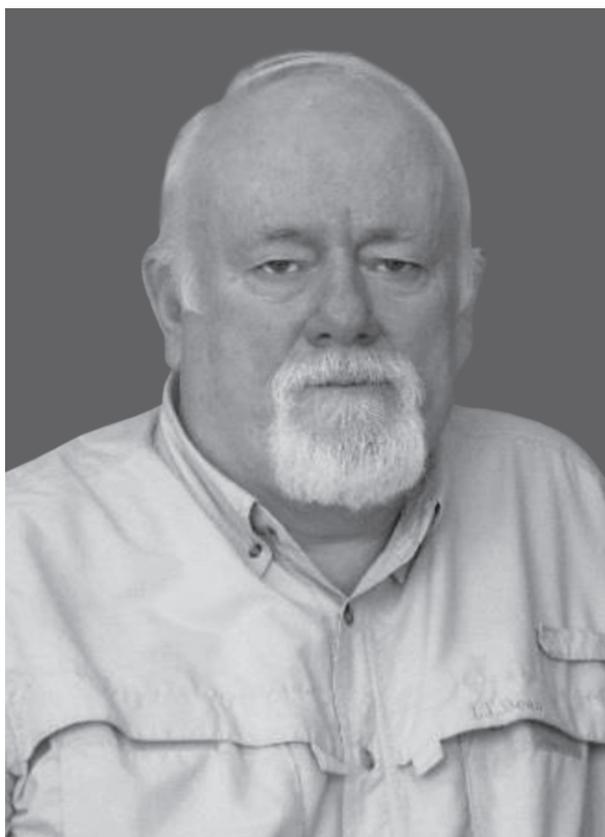
Received March 21, 2018

Abstract—The effect of chitosan (200 kD, 75% deacetylation) on *Nosema apis* development in bee colonies during wintering was investigated. The conditions for development of the nosematous infection were analyzed. According to the results of determination of PCR products specific for *N. apis*, chitosan decreased significantly the degree of infection of individual bees with *N. apis* spores. The scheme of stimulation of the bee immune system by chitosan via the changes in the level of antimicrobial peptides and proteins of the macro-organism antioxidant systems is discussed. Due to a decrease in the degree of infection with *N. apis*, survival of the bees increased during the long winter period.

Keywords: chitosan, *Nosema apis*, *Apis mellifera*, insect immunity

ПАМЯТИ Г. И. НАУМОВА

DOI: 10.1134/S0026365618050129



6 мая 2018 г. на 74 году жизни скоропостижно скончался выдающийся ученый зимолог-генетик — Геннадий Иванович Наумов.

Геннадий Иванович получил блестящее образование, окончив в 1966 году кафедру молекулярной биологии Московского Государственного Университета, а тремя годами позже и аспирантуру этой кафедры. Защитив сначала кандидатскую (1969 г.), а потом и докторскую (1978 г.) диссертации, Геннадий Иванович создал целое научное направление в геносистематике и молекулярной биологии дрожжей. Им детально изучены такие роды дрожжей как *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia/Hansenula*, *Williopsis*, *Zygowilliopsis*, *Lachancea*, *Arthroascus*, *Galactomyces*, *Yarrowia*, *Galactomyces* и *Eremothecium*. Геннадий Иванович не только изучал коллекционные штаммы, но и сам выделял их из разнообразных природных источников многих стран мира.

Следует отметить наиболее приоритетные научные достижения Г. И. Наумова, во многом определившие развитие современной зимологии — науки о дрожжах. В 1969–1972 гг. — генетический анализ природных мутантов впервые показал сложное строение мальтозных полимерных локусов MAL. 1972–1973 гг. — также на основе природных мутантов идентифицирована сложная система генов HML, HMR и HO (в современной символике), ответственных за переключение типов спаривания локуса MAT. 1973 г. — открытие новой токсинообразующей плазмиды [k2], определяющей конкурентоспособность дрожжей в естественных и промышленных популяциях. 1978–1979 гг. — обнаружение регрессивной эволюции ферментации галактозы — потери активных аллелей галактозных генов GAL в некоторых популяциях винных дрожжей. 1989–2002 гг. — открытие суперсемейства 15 мобильных теломерных α -галактозидазных генов MEL. 1969–2002 гг. — разработка концепций биологических видов и генетических родов прежде всего на примере дрожжей *Saccharomyces*. Открытие видов-двойников *S. cerevisiae*: *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*. Три последних вида — новые для науки. 1986–1999 гг. — у дрожжей *S. paradoxus*, на основе гибридационного и изозимного анализов обнаружены частично репродуктивно изолированные популяции в Европе, Северной Америке и на Дальнем Востоке. 1980–2009 гг. — при сотрудничестве с И.П. Бабьевой (1927–2018, каф. биологии почв МГУ) разрабатываются молекулярно-генетические основы классификации почвенных дрожжей *Williopsis* и *Zygowilliopsis*. 1985–2006 гг. — сотрудничество с этой же кафедрой и голландской коллекцией “Центральное бюро грибных культур (CBS)” также привело к современной генетической классификации хищных дрожжей рода *Arthroascus*: восстановлен отечественный вид *A. schoenii*, описаны новые таксоны — вид *A. babjevae* и разновидность *A. fermentans* var. *arxii*. 1986–2008 гг. — разработана генетическая классификация и идентификация молочных дрожжей *Kluveromyces* (syn. *Zygofabospora*) и их диких родственников. Обнаружено суперсемейство β -галактозидазных генов LAC. 2000–2007 гг. — идентифицированы естественные межвидовые гибриды дрожжей *Saccharomyces*.

С 1989 г. по 2017 г. Г.И. Наумов работал в служебных командировках в молекулярно-генетиче-

ских лабораториях Финляндии, Франции, Голландии, Испании, Англии, Дании, Швеции, Венгрии, Словакии, США, Бразилии и Южной Кореи, Тайваня. Неоднократно проводил экспедиционные исследования в Европейской части и на Дальнем Востоке России, в Крыму и в США.

Геннадий Иванович Наумов подготовил для науки несколько десятков учеников, которые продолжают начатые им работы по всестороннему изучению дрожжевых грибов не только в России, но и за рубежом. Под непосредственным его руководством защитили кандидатские диссертации

17 человек, двое из них в последующем стали докторами наук. Список его научных трудов превышает 350 работ, в том числе более 60 из них в международных журналах.

Благодарными учениками и коллегами по совместной работе в честь Г.И. Наумова назван новый род дрожжей *Naumovozyma*, таким образом, увековечив его имя в систематике дрожжей.

Память о выдающемся ученом и просто хорошем человеке навсегда останется в наших сердцах.

Редакция журнала "Микробиология"