

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 3, 2020

Механизмы иммуномодулирующей и мембранотропной активности трегалолипидных биосурфактантов (обзор)

М. С. Куюкина, О. А. Кочина, С. В. Гейн, И. Б. Ившина, В. А. Черешнев 211

Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов (обзор)

А. А. Далинова, Д. Р. Салимова, А. О. Берестецкий 223

Эффект фотодинамической инактивации в отношении покоящихся и активно растущих форм *Mycobacterium smegmatis*

М. О. Шлеева, А. П. Савицкий, В. Д. Никитушкин, И. Д. Соловьёв,
К. А. Трутнева, Я. С. Керученько, А. С. Капрельянец 242

Антимикробная активность липопептида — эмерициллипсина А, выделенного из *Emericellopsis alkalina*, в отношении биопленкообразующих бактерий

В. С. Садыкова, И. А. Гаврюшина, А. Е. Куварица, Н. Н. Маркелова,
Н. Г. Седых, М. Л. Георгиева, А. С. Барашкова, Е. А. Рогожин 250

Оценка биотехнологического потенциала новых штаммов-деструкторов фенола

В. Н. Полищев, Т. О. Анохина, Л. Р. Иминова, О. В. Борзова,
Т. З. Есикова, И. П. Соляникова 257

Получение штамма *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) и его применение для трансформации прогестерона

О. С. Савинова, А. М. Чулкин, Т. С. Савинова, Е. А. Вавилова, Д. В. Васина,
П. Н. Сольев, Т. В. Фёдорова 266

Природные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, перспективные для производства вин типа Херес

С. А. Кишковская, Т. Н. Танащук, М. Ю. Шаламитский, В. И. Загоруйко,
М. И. Ширяев, Д. А. Авданина, М. А. Эльдаров, Н. В. Равин, А. В. Марданов 275

Влияние спектрального состава освещения на выход биомассы, флуоресценцию хлорофилла фотосистемы 2 и общее содержание эфирных масел у *Ocimum basilicum*

В. С. Зотов, Ю. В. Большевцева, С. А. Хапчаева, И. В. Терехова, В. В. Шубин,
Н. П. Юрина, Ю. Н. Кульчин 283

Ароматические карбоновые кислоты корневых экссудатов ячменя и их влияние на рост *Fusarium culmorum* и *Pseudomonas fluorescens*

А. И. Шапошников, В. Ю. Шахназарова, Н. А. Вишневская,
Е. В. Бородина, О. К. Струнникова 292

Содержание карнозина в мышечной ткани осетровых и их гибридов

М. В. Михайлова, В. Н. Прозоровский, К. В. Золотарёв, О. М. Инатова,
А. Н. Михайлов, Е. Н. Харенко, А. В. Артёмов 301

Зависимость содержания липидов и ненасыщенных жирных кислот в скелетных мышцах радужной форели от условий выращивания и физиологического состояния рыб

Н. Н. Фокина, Л. А. Лысенко, Т. Р. Руоколайнен, И. В. Суховская,
Н. П. Канцерова, Н. Н. Немова 305

CONTENTS

Vol. 56, No. 3, 2020

Mechanisms of Immunomodulatory and Membranotropic Activities of Trehalolipid Biosurfactants <i>M. S. Kuyukina, O. A. Kochina, S. V. Gein, I. B. Ivshina, and V. A. Chereshev</i>	211
<i>Alternaria</i> Fungi as Producers of Biologically Active Compounds and Bioherbicides <i>A. A. Dalinova, D. R. Salimova, and A. O. Berestetskiy</i>	223
The Effect of Photodynamic Inactivation Against Dormant Forms and Active Growing Cells of <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>M. O. Shleeva, A. P. Savitsky, V. D. Nikitushkin, I. D. Soloviev, K. A. Trutneva, Ya. S. Keruchenko, and A. S. Kaprelyants</i>	242
Antimicrobial Activity of Lipopeptide – Emericellipsin A, Isolated from <i>Emericellopsis alkalina</i> , Against Biofilm-Forming Pathogenic Clinical Bacteria <i>V. S. Sadykova, I. A. Gavryushina, A. E. Kuvarina, N. N. Markelova, N. G. Sedykh, M. L. Georgieva, A. C. Barashkova, and E. A. Rogozhin</i>	250
Evaluation of Biotechnological Potential of New Bacterial Strains Capable for Phenol Degradation <i>V. N. Polivtseva, T. O. Anokhina, L. R. Iminova, O. V. Borzova, T. Z. Esikova, and I. P. Solyanikova</i>	257
Obtainment of <i>Aspergillus nidulans</i> lac№ 4 (<i>argB</i> [−]) and its Application for Progesterone Transformation <i>O. S. Savinova, A. M. Chulkin, T. S. Savinova, E. A. Vavilova, D. V. Vasina, P. N. Solyev, and T. V. Fedorova</i>	266
Natural Strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Yeasts, Promising for Production of Sherry-Like Wines <i>S. A. Kishkovskaya, T. N. Tanashchuk, M. Yu. Shalamitskiy, V. I. Zagoryiko, M. I. Shiryayev, D. A. Avdanina, M. A. Eldarov, N. V. Ravin, and A. V. Mardanov</i>	275
Effect of Light Quality on the Yield of Biomass, Photosystem 2 Fluorescence and Total Essential Oil Content of <i>Ocimum basilicum</i> <i>V. S. Zotov, Yu. V. Bolychevtseva, S. A. Khapchaeva, I. V. Terekhova, V. V. Shubin, N. P. Yurina, and Yu. N. Kulchin</i>	283
Aromatic Carboxylic Acids in Root Exudates of Barley and Their Influence on Growth of <i>Fusarium culmorum</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>A. I. Shaposhnikov, V. Yu. Shakhnazarova, N. A. Vishnevskaya, E. V. Borodina, and O. K. Strunnikova</i>	292
Carnosine Levels in the Muscle Tissues of Sturgeons and Their Hybrids <i>M. V. Mikhailova, V. N. Prozorovskiy, K. V. Zolotarev, O. M. Ipatova, A. N. Mikhailov, E. N. Kharenko, and A. V. Artemov</i>	301
Dependence of Lipid and Unsaturated Fatty Acid Composition in the Rainbow Trout Skeletal Muscle on the Rearing Conditions and Physiological State of Fish <i>N. N. Fokina, L. A. Lysenko, T. R. Ruokolainen, I. V. Sukhovskaya, N. P. Kantserova, and N. N. Nemova</i>	305

УДК 579.2:571.27

МЕХАНИЗМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ И МЕМБРАНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ТРЕГАЛОЛИПИДНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ (ОБЗОР)

© 2020 г. М. С. Куюкина^{1,2, *}, О. А. Кочина¹, С. В. Гейн^{1,2}, И. Б. Ившина^{1,2}, В. А. Черешнев^{1,2,3}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов,

Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

³Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

*e-mail: kuyukina@ieg.ru

Поступила в редакцию 04.10.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Среди гликолипидных биосурфактантов, которые могут быть использованы в медицине, интенсивно исследуются трегалолипиды актинобактерий рода *Rhodococcus*, менее токсичные по сравнению с микобактериальными ди- и мономиколатами трегалозы. Иммуномодулирующая активность трегалолипидов обусловлена их взаимодействием с поверхностными рецепторами на мембране иммунных клеток и запуском сигнальной системы активации продукции цитокинов, активных форм кислорода, антителогенеза. Благодаря амфифильной природе трегалолипиды воздействуют на липидный бислой клеточных мембран, изменяя его проницаемость. Рассмотренные молекулярные механизмы взаимодействия трегалолипидов с клетками иммунной системы важны для разработки подходов к иммунотерапии.

Ключевые слова: биосурфактанты, гликолипиды, *Rhodococcus*, цитокины, иммуномодулирующая активность, мембранотропное действие

DOI: 10.31857/S0555109920030071

Поверхностно активные вещества (ПАВ) — это соединения, которые снижают поверхностное натяжение двухфазных систем (газ/жидкость, жидкость/жидкость, твердая фаза/жидкость) [1]. ПАВ, сурфактанты, имеют широкое применение в различных областях промышленности. Однако большинство из них являются загрязнителями окружающей среды, а также дороги в производстве [2–4], поэтому в последние годы наблюдается повышенный интерес к биогенным сурфактантам. Биосурфактанты имеют ряд преимуществ по сравнению с синтетическими аналогами, а именно: высокую биodeградируемость, отсутствие токсичности, термо- и рН-стабильность и биологическую активность [6].

Благодаря уникальным физико-химическим свойствам биосурфактанты проявляют биологическую активность, не обнаруживаемую у синтетических аналогов, например, антимикробную, иммуномодулирующую и противоопухолевую [2, 5, 7].

Среди изученных биосурфактантов наиболее интересны в биомедицинском применении гликолипиды [7]. Гликолипидные биосурфактанты имеют общую структуру: гидрофобная часть представ-

лена длинной цепочкой жирных кислот (они могут быть разветвленными, гидроксильными, ненасыщенными, циклосодержащими), а гидрофильный углеводный компонент может быть представлен остатком трегалозы, глюкозы, галактозы, софорозы, рамнозы [8]. Различаются гликолипиды также по количеству углеродных атомов в составе своих цепей (C₂₀–C₉₀) [9].

Первый микробный гликолипид был описан в 1933 г. при изучении туберкулезной палочки *Mycobacterium tuberculosis* [10]. В 1956 г., была установлена химическая структура “корд-фактора” *M. tuberculosis*, представляющего собой смесь трегалозо-6,6-дикориномиколатов (ТДМ) общей формулы C₁₈₆H₃₆₆O₁₇ ± 10CH₂ [11]. Поскольку трегалоза также обладает биологической активностью, являясь частью трегалолипидов, она способствует ее проявлению [5]. Позднее “корд-фактор” и “лизо-корд-фактор”, представленный монокориномиколатом трегалозы, были обнаружены в клетках других патогенных микобактерий (включая, так называемых, “мягких” оппортунистических патогенов группы *Mycobacterium avium* — *M. intracellulare*, нокардий (*Nocardia asteroides*) и коринебактерий (*Corynebacterium diphtheriae*,

C. matruchotii, *C. xerosis*) [12–15]. Однако явная или потенциальная патогенность штаммов-продуцентов, а также высокая токсичность синтезируемых гликолипидов существенно ограничивали их биомедицинское применение [16]. В связи с этим был проведен поиск новых продуцентов гликолипидных сурфактантов среди непатогенных представителей группы “миколат”, то есть актинобактерий, содержащих в составе клеточных липидов высокомолекулярные α -разветвленные β -гидроксильированные жирные (миколовые) кислоты [17], в частности представителей родов *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, *Skermania*, *Williamsia* и др. [9]. Наиболее интенсивно в последние годы исследуются трегалолипидные биосурфактанты, синтезируемые родококками [9, 18, 19]. Следует отметить, что среди родов актинобактерий, входящих в семейства *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* и *Tsukamurellaceae*, объединенные в подпорядок *Corynebacterineae* [20], род *Rhodococcus* характеризуется минимальным числом патогенных и условно патогенных видов и, следовательно, представляют интерес в качестве промышленных продуцентов биосурфактантов [21].

Трегалоллипиды родококков характеризуются чрезвычайно высоким структурным разнообразием, они часто представлены комплексами, состав которых варьирует в зависимости от физиологии и условий роста бактериальной культуры [18]. Кроме ТДМ, моно- и тримиколата трегалозы также описаны другие моно-, ди-, тетра-, гекса-, окта-ацилированные производные трегалозы, составляющие большую группу неионогенных трегалолипидов [22].

Исследуя связь между структурой молекулы и токсичностью гликолипидных биосурфактантов, Б. Мюнстерманн с соавт. показали с помощью биотестирования, что ТДМ и трегало-тетраэфиры из *Rhodococcus erythropolis* были менее токсичными для *Photobacterium fischeri*, чем рамнолипиды из *Pseudomonas aeruginosa* и синтетические ПАВ [23]. Позднее в работе [24] было показано, что неочищенный гликолипидный комплекс из *Rhodococcus ruber* был менее токсичен, чем все биосурфактанты, приведенные в предыдущей работе. Низкая токсичность гликолипидов из *Rhodococcus* spp. была выявлена и в отношении высших организмов. Так трегалолипиды, выделенные из штамма *R. ruber* ИЭГМ 231, не влияли на смертность, изменение массы тела или поведение беспородных белых мышей-самцов и не оказывали цитотоксического действия на лимфоциты человека [25, 26]. Трегалоллипиды из *R. erythropolis* 51T7 были менее токсичны для мышечных фибробластов и кератиноцитов человека, и, следовательно, вызывали меньшее раздражение кожи, чем коммерческий синтетический сурфактант додецилсульфат

натрия [27]. Сукциноил-трегалоллипид из *R. erythropolis* CD-74 не оказывал токсичного воздействия на нормальные фетальные клетки легких человека, но заметно ингибировал рост лейкозных моноцитоподобных клеток, что свидетельствует о его избирательной цитотоксичности в отношении раковых клеток [28]. В тестах на токсичность *in vivo* показано, что ТДМ из *Rhodococcus* sp. 4306 был в 40 раз менее токсичен для мышей, чем ТДМ из *M. tuberculosis*, предположительно, вследствие значительно меньшей длины углеродной цепи миколовых кислот (C_{34} – C_{38} против C_{74} – C_{86}) [29]. Позднее группой авторов [30] было высказано предположение, что длина молекулы миколовых кислот в ТДМ и трегалозомонимиколате (ТММ) из *Rhodococcus* sp. 4306 является ключевым фактором, определяющим более низкую токсичность и меньшую грануломатогенную активность по сравнению с ТДМ из микобактерий [30].

Влияние трегалолипидов на реакции врожденного и адаптивного иммунитета. Известно, что клетки врожденного иммунитета представляют собой основную мишень для бактериальных антигенов. Однако в литературе встречаются данные о влиянии микробных и синтетических трегалолипидов на клетки врожденного иммунитета в системах *in vitro* и *in vivo*, которые существенно различаются по своей направленности. Так в опытах *in vitro* гликолипидные биосурфактанты актинобактерий стимулировали продукцию цитокинов IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12 и IL-10 мононуклеарами и моноцитами периферической крови [18, 25, 31]. Также показана способность биосурфактантов *R. ruber* модулировать цитокинпродуцирующую и поглотительную функции гранулоцитов [29, 32–34].

Под влиянием ТДМ из *M. tuberculosis* было зарегистрировано повышение микробицидной активности, а именно продукции NO в супернатантах мышечных клеток [31]. Аналогичный стимулирующий эффект на продукцию активных форм кислорода в спонтанных культурах лейкоцитов и гранулоцитов человека оказывал гликолипидный комплекс из *R. ruber* ИЭГМ 231 [34]. Результаты работы [35] также указывают на усиление продукции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и NO макрофагами в ответ на присутствие компонентов клеточной стенки коринебактерий. Трегалоллипиды активировали цитокинпродуцирующую функцию дендритных клеток [36], тем самым индуцируя их противоопухолевую активность [28, 37, 38].

В то же время, в системе *in vivo* трегалолипид из *R. ruber* ИЭГМ 231 оказывал угнетающее влияние на динамику респираторного взрыва и продукцию цитокинов перитонеальными клетками мышей при внутрибрюшинном и внутримышечном способах введения [39].

Влияние гликолипидов на адаптивный иммунитет в большей степени является опосредованным, в первую очередь через активацию клеток врожденного иммунитета. Тем не менее, бактериальные гликолипиды модулируют антителогенез, выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), продукцию Th1/Th2-цитокинов (IL-2, IL-4, IFN- γ) [40–42].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют об активирующем влиянии трегалолипидов на функциональную активность макрофагов в системе *in vitro*. Однако направленность их иммуномодулирующего действия в значительной степени различается в моделях *in vitro* и *in vivo*. Так, в системе *in vivo* гликолипиды могут проявить иммуносупрессорные свойства, что, по-видимому, зависит от их химической структуры и агрегатного состояния биосурфактантных мицелл, а также процессов межклеточной кооперации и особенностей взаимодействия с мембраной иммунокомпетентных клеток. По литературным данным, биосурфактанты, имеющие в составе остатки трегалозы и цепи миколовых кислот, контактируют с клетками врожденного иммунитета через ряд поверхностных рецепторов. Распознавание этих гликолипидов осуществляется рецепторами Mincle и MCL, экспрессирующимися на клеточных мембранах гранулоцитов. При контакте рецептора с микробным гликолипидом запускается сигнальная система, приводящая к активации клеток, продукции цитокинов, активных форм кислорода, усилению поглотительной активности гранулоцитов. Опосредованно может изменяться пролиферативная активность лимфоцитов и продукция ими цитокинов.

Рецепторы трегалолипидных биосурфактантов. Паттерн-распознающие рецепторы (PRRs) играют важную роль во врожденном иммунитете. Они способны к распознаванию специфических молекулярных структур, таких как: самоассоциированные молекулярные фрагменты (SAMPs), молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (DAMPs), микробные молекулярные фрагменты (MAMPs) и патоген-ассоциированные фрагменты (PAMPs) [43]. К группе PRRs относятся Толл-подобные рецепторы (TLRs), внутриклеточные нуклеотид-связывающие NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-I-подобные рецепторы и лектиновые рецепторы С-типа (CLRs) [44, 45]. Одновременный запуск нескольких PRRs вызывает внутриклеточный каскад реакций, приводящих к активации врожденного иммунитета, необходимого для формирования эффективного адаптивного иммунного ответа [46].

CLRs представляют большое семейство консервативных рецепторов позвоночных животных, которые связывают остатки углеводов [47]. Они распознают различные эндогенные и экзо-

генные лиганды патогенов, таких как грибы, бактерии и паразиты [48].

Макрофагальный индуцибельный лектин С-типа (Mincle или CLEC4e, Clec5f9) и макрофагальный лектин С-типа (MCL или CLEC4d, Clec5f8) являются рецепторами ТДМ [49]. Данные рецепторы относятся к отдельной группе лектинов С-типа, так как для осуществления связывания лиганда в распознающем углевод домене им необходимо присутствие ионов Ca^{2+} [47].

Mincle-рецептор. Впервые рецептор Mincle был идентифицирован в работе [50] как белок, который экспрессируется в ответ на стимуляцию липополисахаридом (ЛПС) и некоторыми провоспалительными цитокинами, такими как IFN- γ , IL-6, и TNF- α . Он относится ко II типу трансмембранных лектиновых рецепторов С-типа, которые экспрессируются у человека и грызунов на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах, дендритных клетках и некоторых субпопуляциях В-лимфоцитов при их стимуляции [50–53]. У морских свинок Mincle также присутствует на клетках лимфоузлов, селезенки и перитонеальных макрофагах [54].

Структурно Mincle состоит из внеклеточной части, которая несет углеводраспознающий домен (CRD), отделенный от мембраны короткой ножкой, а также трансмембранный участок и короткий цитоплазматический хвост, не имеющий сигнальной последовательности (рис. 1) [52, 55]. В своем трансмембранном участке Mincle содержит положительно заряженный аргинин, который опосредует взаимодействие рецептора с иммунорецепторной тирозиновой активирующей последовательностью (ITAM) Fc рецептора γ -цепи (FcR γ), тем самым осуществляя передачу сигнала внутрь клетки [53]. Распознавание лиганда приводит к фосфорилированию ITAM и активации тирозинкиназы Syk, запуская каскад реакций через сигнальный комплекс Card9-Bcl10-MALT1 и высвобождая ядерный фактор каппа В (NF κ B) [56].

Детальные исследования лигандов Mincle показали, что он связывает гликолипиды, выделенные из *M. tuberculosis*, такие как трегалозодимиколат, трегалозомономиколат и глицеролмономиколат (ГММ) [57]. Однако ГММ приводит к меньшей активации Mincle и распознается избирательно только человеческим рецептором, но не мышинным. Кроме того, лигандом Mincle является и синтетический аналог ТДМ – трегалозодибегенат (ТДБ) [58]. Также Mincle способен распознавать целый ряд грибных патогенов, включая *Candida albicans* и нестандартные глицерогликолипиды гриба *Malassezia* [59–61].

Взаимодействие лигандов с человеческим или мышинным CRD-доменом Mincle осуществляется благодаря наличию консервативной для лектинов последовательности: глутаминовая кислота–пролин–аспарагин (EPN, остатки 169–171), ко-

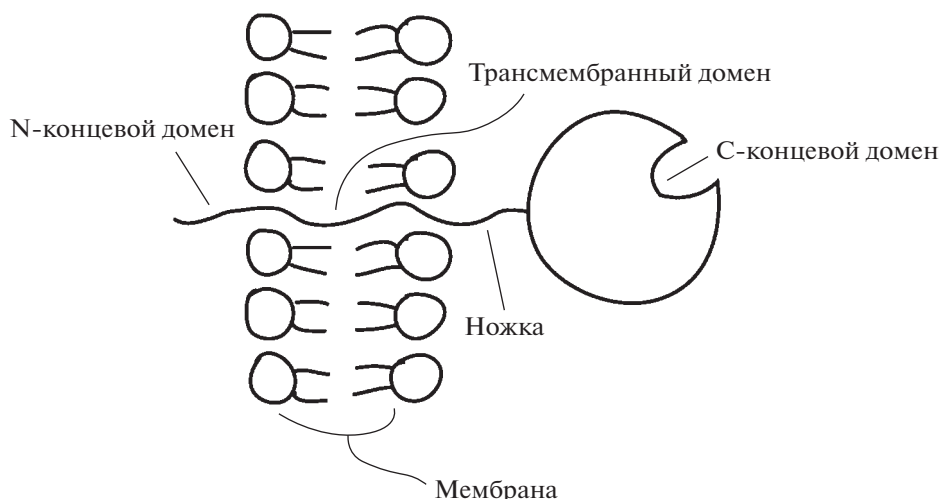


Рис. 1. Структура рецептора Mincle, состоящая из короткого N-концевого цитоплазматического домена, трансмембранного домена и С-терминального участка CRD, отделенного от мембраны короткой ножкой [55].

торая является также необходимой для связывания с ТДМ [57].

В работе [55] проведены сравнительные исследования биохимических особенностей связывания ТДМ с мышинными, человеческими и бычьими углевод-распознающими доменами рецептора Mincle. Результаты показали сохранение способности к распознаванию гликолипида у Mincle различного происхождения, что свидетельствует о возможности исследования данного рецептора на животных и интерпретации полученных результатов на человека [55].

Понимание механизмов распознавания углеводов рецептором Mincle получено с помощью комплекса бычьего рецептора Mincle с ТДМ. В этом комплексе, один из двух остатков глюкозы, входящих в состав ТДМ, распознается первичным углеводсвязывающим сайтом. Он состоит из 5 аминокислотных остатков, связанных с ионом Ca^{2+} , 4 из которых (Glu-176, Asn-192, Glu-168 и Asn-170) образуют водородные связи с 3 и 4 ОН-группами глюкозы, также взаимодействующими с ионом Ca^{2+} . Второй остаток глюкозы связывается вторичным углеводсвязывающим сайтом, в котором Glu-135 и Arg-182 формируют водородные связи со 2 ОН- группой остатка глюкозы [58]. Вблизи первичного углеводсвязывающего сайта располагается небольшой участок, состоящий из гидрофобных аминокислот, отсутствующий у большинства классических доменов С-типа. Он вмещает в себя ацильные цепи, присоединяющиеся к 6 ОН-группе остатка глюкозы, в первичном сайте связывания (рис. 2). Авторами показано, что достаточно одной ацильной цепи для связывания с Mincle, однако, обязательным условием является длина липидного фрагмента, которая должна быть не менее 10 углеродных остат-

ков. Эти сайты могут включать разветвленные ацильные цепи миколовых кислот, содержащиеся в ТДМ и ТММ [58].

Аналогично некоторым другим представителям CLRs, Mincle способен распознавать DAMPs. Поврежденные и мертвые клетки высвобождают белок, ассоциированный со сплайсosomal 130 (SAP 130), который передает внутриклеточный сигнал, связываясь с внедоменной частью рецептора [53]. Также Mincle связывает кристаллы холестерина, формирующегося на атеросклеротических бляшках при гиперхолестеринемии [62].

MCL-рецептор. Более 20 лет назад во время создания библиотеки мышинных макрофагальных генов был идентифицирован рецептор MCL, состоящий из 219 аминокислотных остатков [63]. MCL, как и Mincle, является С-лектиновым рецептором II типа, имеющим сходную структурную организацию: один распознающий домен на ножке и трансмембранный участок с коротким цитоплазматическим хвостом [64]. Данный рецептор также требует присутствия другого рецептора — FcR γ для осуществления передачи сигнала внутрь клетки через сигнальный путь Syk/CARD9 [65]. Однако природа взаимодействия с адаптерным белком не достаточно ясна, так как MCL не содержит необходимого остатка аргинина в трансмембранном участке для ассоциации с ITAM, тем самым ставя под вопрос непосредственную связь с FcR γ [66]. Предположительно, MCL и Mincle связываются ковалентно, образуя гетеродимер, в котором Mincle выступает в роли мостика между рецептором MCL и белком FcR γ (рис. 3) [66, 67]. Возможность такой связи доказывают данные о прямо-пропорциональной зависимости экспрессии этих двух рецепторов, полученные в спонтан-

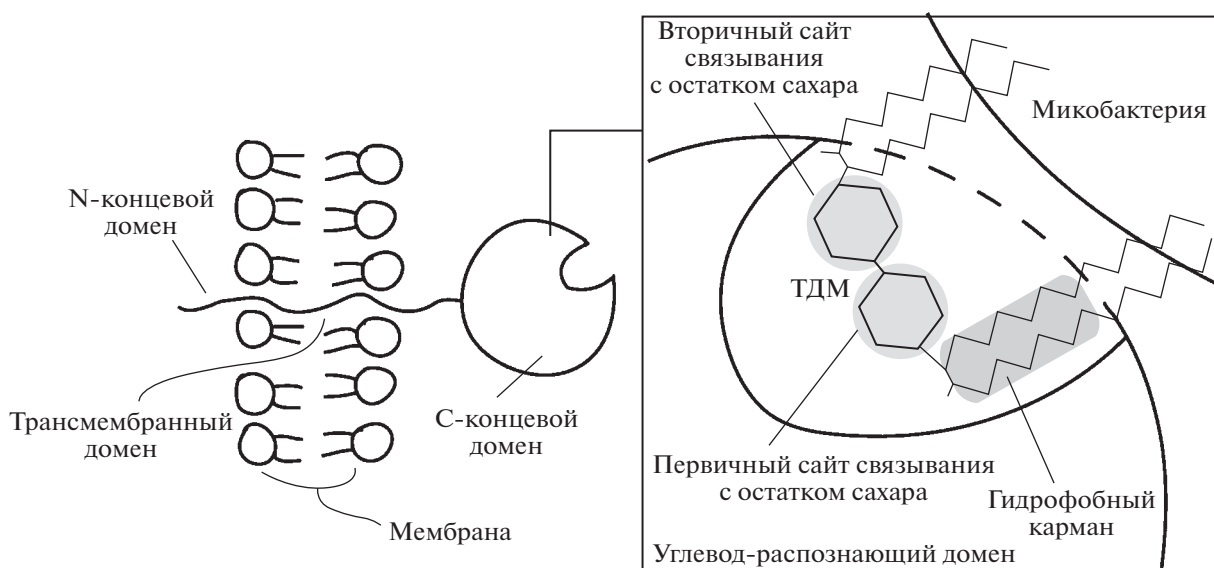


Рис. 2. Модель взаимодействия Mincle с микобактерией. Mincle, располагающийся на поверхности макрофага, образует связь с ТДМ на поверхности микобактерии [58].

ных и ЛПС-стимулированных культурах перитонеальных макрофагов крысы [67].

MCL был первоначально охарактеризован как рецептор, конститутивно экспрессирующийся у мышей исключительно на макрофагах [63]. Однако дальнейшее изучение MCL у человека показало не только экспрессию на макрофагах (синовиальных, перитонеальных и пришедших из крови моноцитах), но и на клетках Лангерганса, нейтрофилах, моноцитах, а также зрелых и незрелых дендритных клетках [64]. У крыс MCL был обнаружен на макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках, В- и Т-лимфоцитах [58, 67].

В отличие от классических лектинов С-типа, MCL не имеет типичной последовательности EPN для распознавания углеводов. Она отличается остатком аминокислоты по последнему положению, например, у крыс аспарагин заменяется лизином, у человека аспаратом, а у мышей остается неизменным [43].

В целом, структура и локализация аминокислотных остатков и позиции ионов Ca^{2+} в углевод-распознающем домене у Mincle и MCL похожи, однако Mincle имеет два иона Ca^{2+} тогда как MCL — только один. Эти результаты указывают, что Mincle и MCL распознают углеводы через данные последовательности немного по-разному, но аналогичным образом [49].

М. Ямасаки и соавт. показали, что MCL, как и Mincle, является рецептором ТДМ и его синтетического аналога — ТДБ [61]. Однако прямое связывание ТДМ с MCL гораздо слабее, чем с Mincle, то есть MCL обладает меньшей аффинностью к ТДМ. Различия в аффинности этих двух CLR-ре-

цепторов может быть объяснено разницей в размерах их гидрофобных зон. Mincle обладает большим гидрофобным участком (Val195, Thr196, Phe198, Leu199, Tyr201 и Phe202) по сравнению с MCL (Val197, Pro198 и Phe201) [49]. Однако оказалось затруднительным установить другие гликолипидные лиганды для MCL, так, в частности, не увенчался успехом поиск среди 326 углеводных лигандов и целого ряда моносахаридов [68]. По мнению Д.Г. Смита, такие результаты свидетельствуют о том, что MCL не является углеводсвязывающим рецептором, а его взаимодействие с ТДМ осуществляется через липидный хвост последнего [43]. Следует отметить, что MCL также является рецептором, участвующим в эндоцитозе, что не отрицает возможности его участия в процессе переработки антигена [64].

По предположению Б. Мартина, $\gamma\delta\text{T}$ -лимфоциты, экспрессирующие MCL и $\text{Fc}\gamma\text{R}$, способны распознавать ТДМ и продуцировать в ответ цитокины независимо от Т-клеточного рецептора (TCR) [69].

В работе [70] показано взаимное влияние экспрессии рецепторов MCL и Mincle. Эксперименты *in vivo* и *in vitro*, проведенные в спонтанных и стимулированных ЛПС и БЦЖ (Бацилла Кальметта-Герена) культурах перитонеальных макрофагов мышей, показали, что экспрессия Mincle снижается в отсутствие MCL и наоборот [70]. Однако у клеток, лишенных Mincle, экспрессия генов MCL остается достоверно высокой на внутриклеточном уровне, а для локализации рецептора на поверхности требуется коэкспрессия рецептора Mincle. Таким образом, экспрессия обоих рецепторов носит взаимозависимый характер и форми-

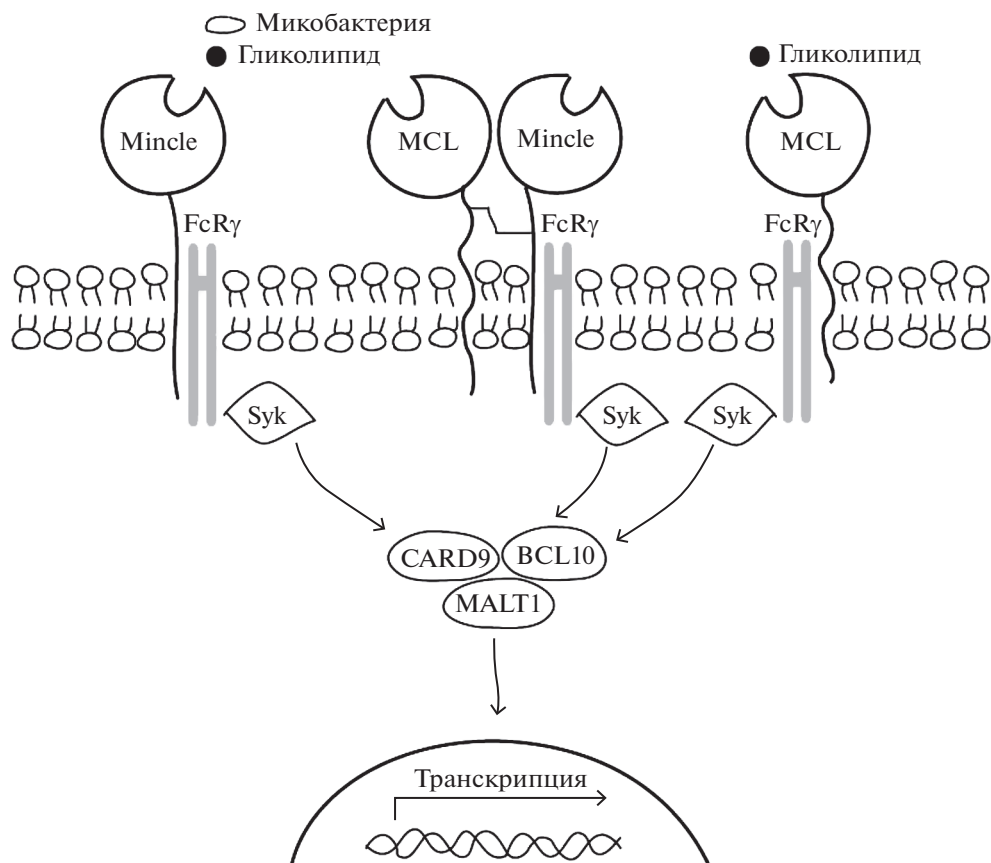


Рис. 3. Слева и справа: Связывание микробных гликолипидов с Mincle/MCL приводит к активации транскрипционного фактора NFκB, который вызывает продукцию цитокинов, активирующих наивные Т-клетки. По центру: MCL образует гетеродимер с Mincle, что позволяет передать сигнал через FcRγ [66].

рует необходимый функциональный рецепторный комплекс на клеточной поверхности [64].

Сравнительно недавние исследования в области геномного секвенирования показали, что Mincle и MCL не только гомологичны друг к другу, но также высоко консервативны у разных организмов. Поиск местоположения генов данных CLRс у различных видов млекопитающих показал, что однопроходные и сумчатые обладают только рецепторами Mincle, тогда как плацентарные экспрессируют Mincle и MCL. У мышей и человека гены обоих рецепторов располагаются на 6 (6F3) и 12 (12p13) хромосоме соответственно [71].

CD1-рецептор. Молекулы CD1 представляют собой класс МНС-подобных молекул, которые развили способность к презентации липидов. У человека 5 генов CD1, которые впервые были клонированы в 1986 г. [72]. Эти гены расположены в первой хромосоме, и проявляют очень ограниченный полиморфизм. Возможно, недостаток функционального полиморфизма является результатом селективного давления в пользу способности связывать структурноконсервативные антигены и облегчать контакт с TCR (Т клеточный рецептор)

[73]. Четыре изоформы CD1 участвуют в презентации липидов: CD1a, CD1b, CD1c и CD1d. Пятый, CD1e, являясь белком-переносчиком липидов, представляет собой единственный изотип, который напрямую не презентует Т-клеткам антигены, однако играет важную роль в их процессинге и встраивании в CD1 [74, 75]. CD1a, CD1b и CD1c формируют первую группу молекул CD1, экспрессия генов которой индуцируется на миелоидных клетках, в то время как вторая группа, представленная CD1d, экспрессируется конститутивно. Каждая из изоформ имеет особенную молекулярную архитектуру, которая определяет специфичность молекулы CD1 к определенному спектру липидов (рис. 4) [76–78]. Так изоформы CD1 экспрессируются на различных типах клеток, таких как миелоидные дендритные клетки (имеют 5 изоформ белков CD1), клетки Лангерганса (CD1a, CD1e), и В-клетки (CD1c, CD1d) [73]. Гены CD1 также были обнаружены в тимусе, где они экспрессируются на тимоцитах [79].

Молекулы CD1 – это гетеродимеры, состоящие из тяжелой цепи нековалентно связанной с β2-микроглобулином. Тяжелая цепь CD1 состоит

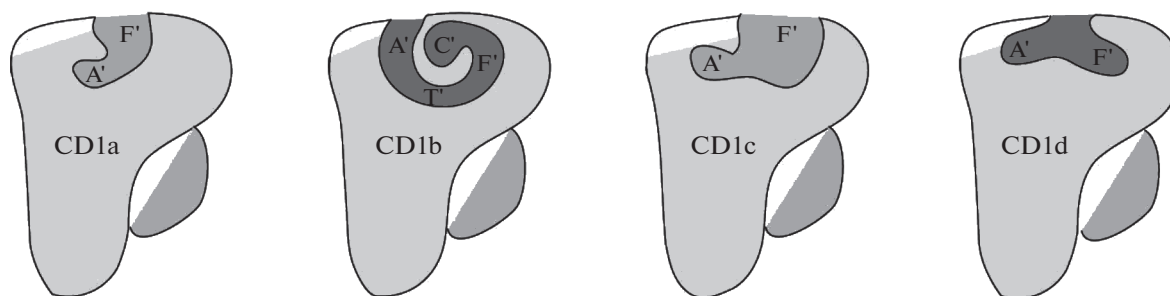


Рис. 4. Схематичное изображение структуры человеческой молекулы CD1 в 4х изоформах: CD1a, b, c, d [76].

из трех доменов: $\alpha 1$, $\alpha 2$, и $\alpha 3$ и трансмембранного домена, который заякорен в мембране. В то время как домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ обладают большим разнообразием изоформ и образуют центральную связывающую полость, домен $\alpha 3$ наиболее консервативен и ассоциирован с $\beta 2$ -микроглобулином [80, 81]. У CD1 антигенсвязывающая область образована сетью гидрофобных карманов, отвечающих за связывание липидных молекул [73]. Объем таких областей варьирует среди изоформ с тенденцией: CD1a < CD1d < CD1c < CD1b. Размер и форма этих полостей коррелируют с размером гидрофобных цепей липидов, которые они могут презентировать [82]. Как правило, каждая молекула CD1 содержит, по меньшей мере, 2 гидрофобных кармана (так называемые A' и F'), которые связывают антиген [83]. В то время как карман A' имеет больший размер и более глубокое погружение, область F' является более открытой и доступной для захвата антигена [84].

Информация, находящаяся в молекуле CD1 считывается через распознавание Т-клетками [78, 85, 86]. В презентации микобактериальных липидов, включая миколовые кислоты и глюкозо- и глицерол-мономиколаты, выделенные из бактерий родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* и *Nocardia*, участвует изоформа CD1b [87, 88]. CD1b, являясь самым сложным членом семейства CD1, имеет самую большую связывающую полость среди всех изоформ. Впервые структура CD1b была изучена на примере комплекса с фосфатидилинозитолом или ганглиозидами, благодаря чему было установлено, что связывающая полость состоит из 4 соединенных карманов: A', C', F', и T' [76]. Такая уникальная архитектура CD1b позволяет связывать очень большие антигены длиной до 80 атомов углерода [82].

Таким образом, Mincle и MCL являются основными рецепторами клеточной мембраны иммунных клеток, связывающими трегалолипидные биосурфактанты. Распознавание гликолипидных молекул реализуется также посредством рецептора CD1b, который презентует микобактериальные гликолипиды Т-лимфоцитам, обеспечивая иммунный ответ на липид-содержащие антигены.

Взаимодействие трегалолипидов с биологическими мембранами. Для объяснения разноплановых иммунорегуляторных эффектов трегалолипидных биосурфактантов важно понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе их взаимодействия с поверхностными структурами иммунокомпетентных клеток. Выраженная амфифильная природа и биологическая активность трегалолипидов определяют направленность их воздействия на липидные молекулы биологических мембран. К основным структурным компонентам мембран эукариотных клеток относятся глицерофосфолипиды: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ) и фосфатидовая кислота (ФК). Их гидрофобной частью является диацилглицерин, содержащие насыщенные или цис-ненасыщенные жирные кислоты с различной длиной цепи [89].

Группой исследователей [90, 91] были изучены физико-химические свойства трегалолипидного биосурфактанта из *Rhodococcus* sp. 51T7, а также особенности его взаимодействия с мембранами, состоящими из цвиттерионных фосфолипидов (ФХ или ФЭА) с различными длинами ацильных цепей. Выявлено, что сукционил-трегалолипид встраивается между молекулами мембраны с образованием сурфактантных доменов. Эти биосурфактантные структуры хорошо визуализировались методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), однако не изменяли макроскопическую двухслойную организацию мембраны [92].

Полученные в работе [93] АСМ-изображения трегалолипидного биосурфактанта из *R. ruber* ИЭГМ 231 выявили образование трех типов молекулярных структур в зависимости от концентрации (рис. 5). Так при низкой концентрации (100 мг/л) наблюдались мицеллоподобные структуры со средним диаметром 30–50 нм, которые либо располагались одиночно, либо были собраны в длинные тяжи. При более высокой концентрации (1000 мг/л) биосурфактант агрегировался в крупные везикулы неправильной формы диаметром 100–300 нм. Механизмы спонтанного перехода монодисперсных мицелл в агрегаты более

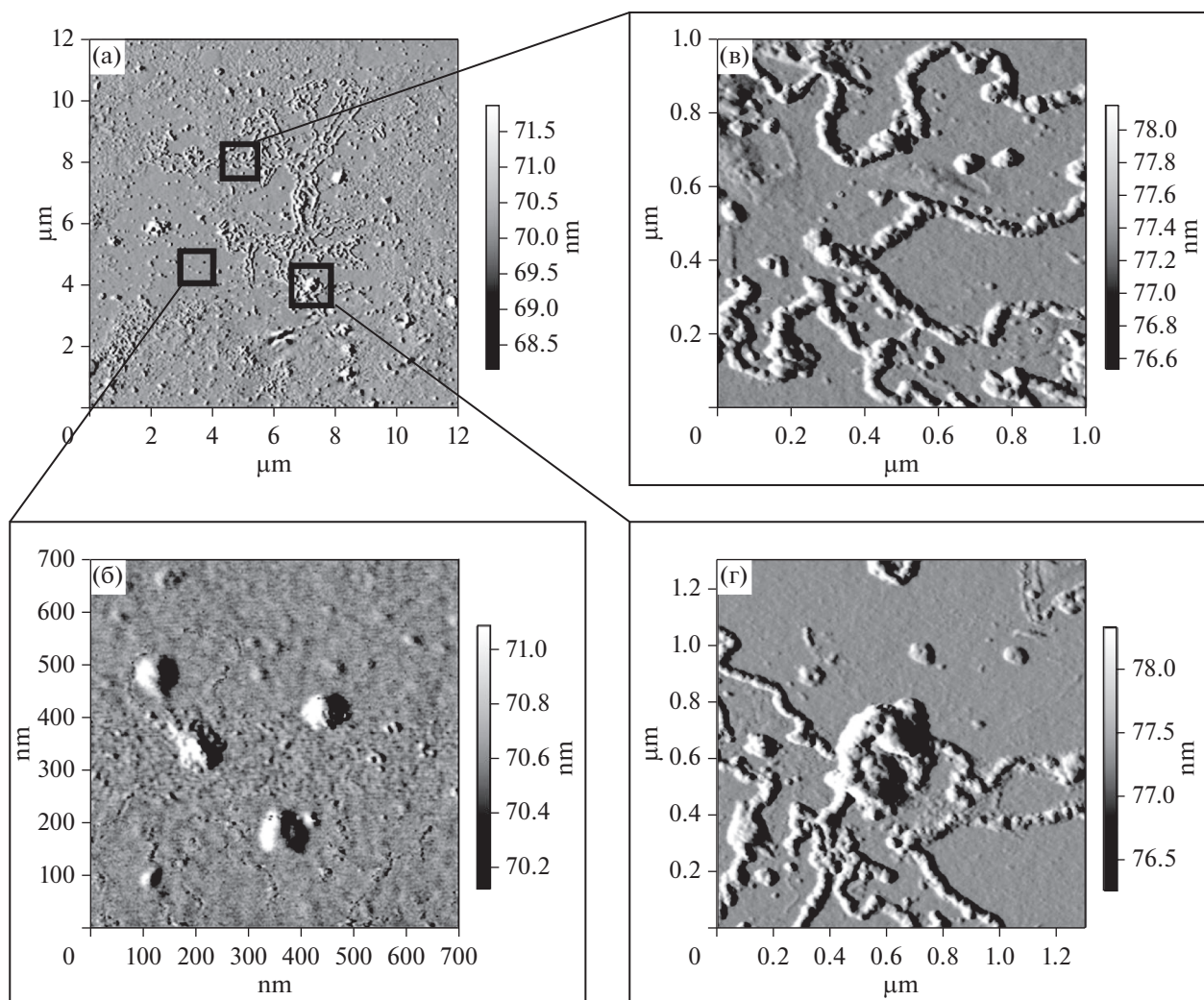


Рис. 5. АСМ-изображения трех типов молекулярных структур трегалолипидного биосурфактанта из *R. ruber* ИЭГМ 231 [93]. а — общий вид; б — мицеллы размером 30–50 нм; в — тяжи длиной 0.2–2 мкм; г — везикулы диаметром 100–300 нм.

высокого порядка при увеличении концентрации сурфактантов рассмотрены в работе [94].

По данным [92, 95], в присутствии трегалолипида из *Rhodococcus* sp. 51Т7 происходили следующие изменения мембранных структур: нарушалась конформация и кооперативность ФХ и ФЭА, увеличивалась текучесть их ацильных цепей, наблюдалась дегидратация межфазового пространства и повышалась толщина липидного бислоя.

Кроме незаряженных фосфолипидов в мембранах присутствуют в значительных количествах анионные фосфолипиды, которые являются ключевыми функциональными компонентами. В эукариотических мембранах основным анионным фосфолипидом является фосфатидилсерин [96]. Трегалоллипид из *Rhodococcus* sp. 51Т7 оказывал аналогичное влияние на структурные свойства ФС, как и на нейтрально заряжен-

ные фосфолипиды, но, кроме того, понижал температуру фазового перехода из жидкокристаллической фазы в гель и наоборот [27, 97].

Этими же авторами изучена мембранотропная активность трегалолипидного биосурфактанта из *Rhodococcus* sp. 51Т7. Было установлено, что этот трегалолипид вызывает гемолиз человеческих эритроцитов через коллоидно-осмотический механизм [98]. С использованием искусственных мембран было выявлено, что трегалолипид образует пористые структуры при встраивании в мембранный бислой, тем самым индуцируя его пермеабиллизацию. Возможно, трегалолипиды повышают проницаемость мембран эритроцитов по механизму формирования пермеабиллизующих доменов. Однако липидный состав клеточной мембраны оказывает влияние на мембранотропную активность трегалолипидов. Так, наличие холесте-

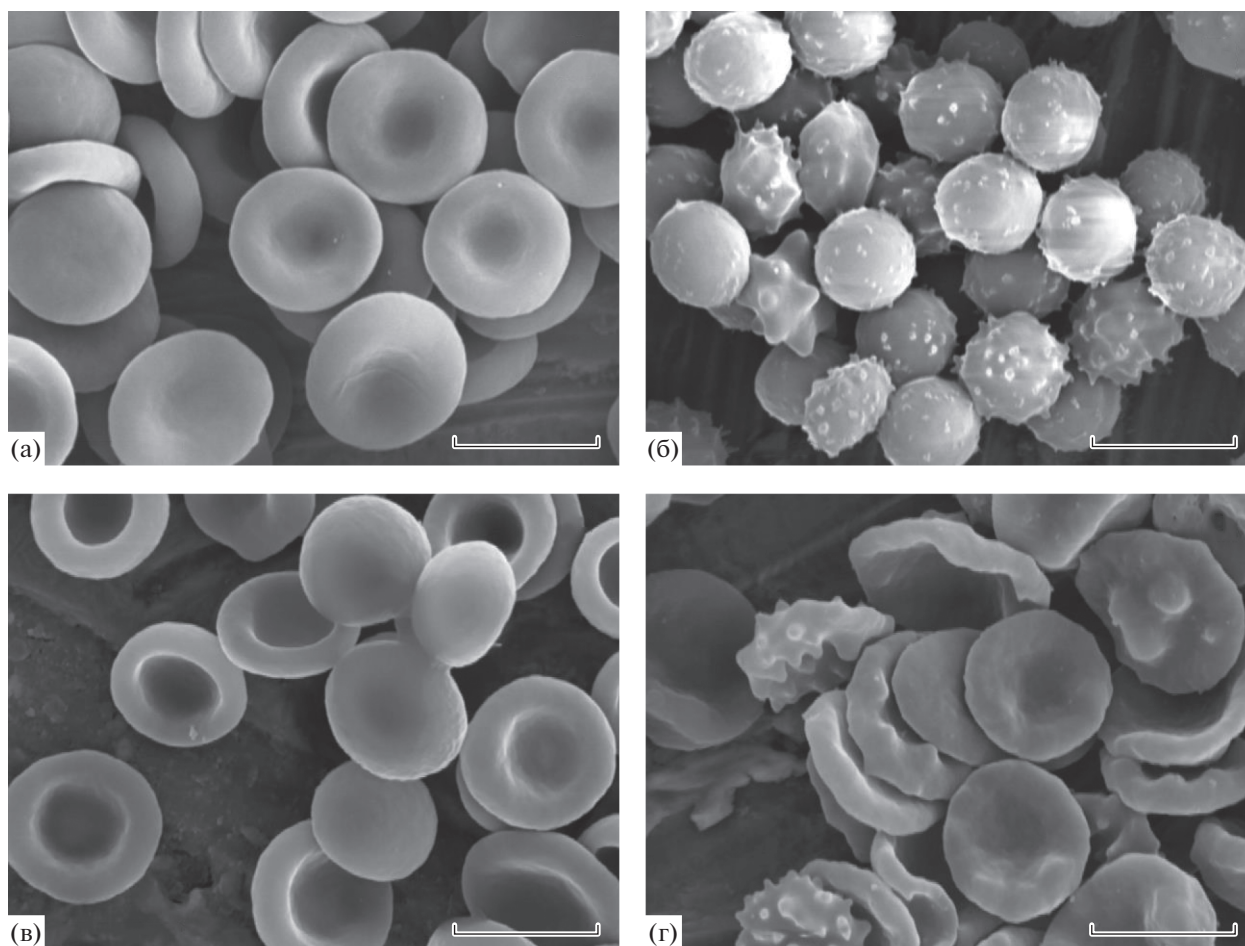


Рис. 6. Влияние трегалолипидов на морфологию эритроцитов человека: СЭМ контрольных эритроцитов в отсутствие (а) и в присутствии ПЭГ 3350 (в), эритроцитов, инкубированных с 60 мкм трегалолипида в отсутствие (б) и в присутствии ПЭГ 3350 (г). Масштабная линейка соответствует 5 мкм [98].

рола препятствовало повышению проницаемости мембраны под действием трегалолипида, что, по видимому, обуславливает его различную активность в отношении мембран прокариотных и эукариотных клеток [99]. С помощью сканирующей электронной микроскопии выявлены морфологические изменения красных кровяных телец при инкубации с трегалолипидом, в частности сфероцитоз (раздутые шарообразные) и эхиноцитоз (шиповатой формы) клеток (рис. 6) [98]. Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о взаимодействии бактериальных гликолипидов, в частности трегалолипидов, с мембранами иммунных клеток.

Таким образом, актинобактерии рода *Rhodococcus*, синтезирующие трегалолипидные биосурфактанты, могут рассматриваться как перспективные продуценты новых биоактивных молекул для возможного применения в биомедицине. Высокая иммуномодулирующая активность ТДМ, ТММ и других трегалолипидов родококков, их низкая токсичность по сравнению с микобактериальными

производными определяют существенные преимущества их клинического применения. Недавними исследованиями на мембранах клеток врожденного иммунитета показано, что бактериальные трегалолипиды связываются с высокоаффинными рецепторами, к которым относятся Mincle и MCL-рецепторы лектинового семейства. Взаимодействие с данными рецепторами обеспечивает высокую иммунорегуляторную активность трегалолипидов за счет экспрессии транскрипционного фактора Nf-kb, который вызывает продукцию провоспалительных цитокинов. Основываясь на расшифровке молекулярных механизмов взаимодействия трегалолипидов с клетками иммунной системы, могут быть открыты новые подходы к иммунотерапии.

Работа выполнена в рамках госзаданий ААААА19-119112290010-7 (ИЭГМ УрО РАН) и 6.3330.2017/4.6 (ПГНИУ) при частичной поддержке гранта Российского научного фонда 18-14-00140.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Banat I.M., De Rienzo M.A., Quinn G.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 24. P. 9915–9929.
2. Gudiña E.J., Rodrigues A.I., Alves E., Domingues M.R., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. // Bioresour. Technol. 2015. V. 177. № 2. P. 87–93.
3. Lechuga M., Fernández-Serrano M., Jurado E., Olea J.N. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2016. V. 125. № 3. P. 1–8.
4. Liu J., Chen Y., Xu R., Jia Y. // Indian J. Microbiol. 2013. V. 53. № 2. P. 168–174.
5. Paulino B.N., Pessôa M.G., Mano M.C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 24. P. 10265–10293.
6. Soberón-Chávez G., Maier R.M. Biosurfactants: from Genes to Applications. Ed. G. Soberón-Chávez. Berlin: Springer-Verlag, 2011. P. 1–11.
7. Cameotra S.S., Makkar R.S. // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. № 3. P. 262–266.
8. Mukherjee A.K., Das K. // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2010. V. 672. P. 54–64.
9. Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T.J. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010. V. 112. № 6. P. 617–627.
10. Anderson R.J., Newman M.S. // Biol. Chem. 1933. V. 101. P. 499–504.
11. Noll H., Bloch H., Asselineau J. // Biochim. Biophys. Acta. 1956. V. 20. № 2. P. 299–309.
12. Fujiwara N., Pan J., Enomoto K., Terano Y., Honda T., Yano I. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1999. V. 24. № 2. P. 141–149.
13. Gerson D.F., Cooper D.G., Ramsay B., Zajic J.E. // Can. J. Microbiol. 1980. V. 26. № 12. P. 1498–500.
14. Margaritis A., Zajic J.E., Gerson D.F. // Biotechnol. Bioeng. 1979. V. 21. № 7. P. 1151–1162.
15. Retzinger G.S., Meredith S.C., Takayama K., Hunter R.L., Kézdy F.J. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 15. P. 8208–8216.
16. Watanabe M., Kudoh S., Yamada Y., Iguchi K., Minnikin D.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1165. № 1. P. 53–60.
17. Chun J., Kang S.-O., Hah Y.C., Goodfellow M. // J. Industrial Microbiology. 1996. V. 17. № 3–4. P. 205–213.
18. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Application of Rhodococcus in bioremediation of contaminated environments / In: *Microbiology Monographs*. Ed. A. Steinbuchel. Dordrecht; London; N.Y.: Springer-Verlag, 2010. V. 16. P. 231–262.
19. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. // J. Appl. Microbiol. 2013. V. 115. № 3. P. 744–755.
20. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. № 2. P. 479–491.
21. Haburchak D.R., Jeffery B., Higbee J.W., Everett E.D. // Am. J. Med. 1978. V. 65. № 2. P. 298–302.
22. Kügler J.H., Krasowska A., Czyżnikowska Ż., Łukasiewicz M. // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. V. 98. № 21. P. 8905–8915.
23. Munstermann B., Poremba K., Lang S., Wagner F. Studies on Environmental Compatibility: Influence of (bio)surfactants on marine microbial and enzymatic systems / In *Proceedings of the International Symposium on Soil Decontamination Using Biological Processes*. Karlsruhe, Germany, 6–9 December 1992. P. 414–420.
24. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. № 5. P. 711–717.
25. Gein S.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Bayeva T.A., Chereshev V.A. // Cytotechnology. 2011. V. 63. № 6. P. 559–566.
26. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gein S.V., Baeva T.A., Chereshev V.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2007. V. 144. № 3. P. 326–330.
27. Marques A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A., Espuny M.J. // Chem. Phys. Lipids. 2009. V. 158. № 2. P. 110–117.
28. Isoda H., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T. // Cytotechnology. 1996. V. 19. № 1. P. 79–88.
29. Sakaguchi I., Ikeda N., Nakayama M., Kato Y., Yano I., Kaneda K. // Infect. Immunity. 2000. V. 68. № 4. P. 2043–2052.
30. Ueda S., Fujiwara N., Naka T., Sakaguchi I., Ozeki Y., Yano I., Kasama T., Kobayashi K. // Microb. Pathog. 2001. V. 30. № 2. P. 91–99.
31. Lima V.M., Bonato V.L., Lima K.M., Dos Santos S.A., Dos Santos R.R., Gonçalves E.D., Faccioli L.H., Brandão I.T., Rodrigues-Junior J.M., Silva C.L. // Infect. Immun. 2001. V. 69. № 9. P. 5305–5312.
32. Chereshev V.A., Gein S.V., Baeva T.A., Galkina T.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. // Bull. Exp. Biol. Med. 2010. V. 149. № 6. P. 734–738.
33. Yasuda K. Complement activation by mycoloyl glycolipids from Mycobacterium tuberculosis and Rhodococcus ruber // Osaka City Med. J. 1999. V. 45. P. 159–174.
34. Баева Т.А., Гейн С.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б., Кочина О.А., Черешнев В.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157. № 2. С. 202–206.
35. Schick J., Etschel P., Bailo R., Ott L., Bhatt A., Lepenies B., Kirschning C., Burkovski A., Lang R. // Infect Immun. 2017. V. 85. № 7. <https://doi.org/10.1128/IAI.00075-17>
36. Tima H.G., Al Dulayymi J.R., Denis O., Lehebel P., Baols K.S., Mohammed M.O., L'Homme L., Sahb M.M., Potemberg G., Legrand S., Lang R., Beyaert R., Piette J., Baird M.S., Huygen K., Romano M. // J. Innate Immun. 2017. V. 9. № 2. P. 162–180.
37. Isoda H., Kitamoto D., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997. V. 61. № 4. P. 609–614.
38. Sudo T., Zhao X., Wakamatsu Y., Shibahara M., Nomura N., Nakahara T., Suzuki A., Kobayashi Y., Jin C., Murata T., Yokoyama K.K. // Cytotechnology. 2000. V. 33. № 1–3. P. 259–264.
39. Кочина О.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б. // Российский иммунологический журн. 2017. Т. 11. № 3. С. 396–398.
40. Bhunia D., Pallavi P.M., Bonam S.R., Reddy S.A., Verma Y., Halmuthur M.S. // Arch. Pharm. 2015. V. 348. № 10. P. 689–703.
41. Emoto M., Emoto Y., Buchwalow I.B., Kaufmann S.H. // Eur. J. Immunol. 1999. V. 29. № 2. P. 650–659.

42. Anderson B.L., Teyton L., Bendelac A., Savage P.B. // *Molecules*. 2013. V. 18. № 12. P. 15662–15688.
43. Smith D.G., Williams S.J. // *Carbohydr. Res.* 2016. V. 420. P. 32–45.
44. Akira S. TLR signaling // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. V. 311. P. 1–16.
45. Kawai T., Akira S. // *Cell Death Differ.* 2006. V. 13. № 5. P. 816–825.
46. Geijtenbeek T.B., Gringhuis S.I. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. V. 9. № 7. P. 465–479.
47. Zelensky A.N., Gready J.E. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 24. P. 6179–6217.
48. Kerscher B., Willment J.A., Brown G.D. // *Int. Immunol.* 2013. V. 25. № 5. P. 271–277.
49. Furukawa A., Kamishikiryo J., Mori D., Toyonaga K., Okabe Y., Toji A., Kanda R., Miyake Y., Ose T., Yamasaki S., Maenaka K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 43. P. 17438–43.
50. Kawata K., Illarionov P., Kenny T., Zhang W., Tsuda M., Ando Y., Leung P., Ansari A.A., Gershwin M.E. // *J. Autoimmun.* 2012. V. 39. № 4. P. 315–322.
51. Lee W.B., Kang J., Yan J., Lee M.S., Jeon B., Cho S., Kim Y.J. // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. № 4. P. 1–19.
52. Matsumoto M., Tanaka T., Kaisho T., Sanjo H., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Akira S. // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 9. P. 5039–5048.
53. Yamasaki S., Ishikawa E., Sakuma M., Hara H., Ogata K., Saito T. // *Nat. Immunol.* 2008. V. 9. № 10. P. 1179–1188.
54. Toyonaga K., Miyake Y., Yamasaki S. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 2. P. 1–11.
55. Rambaruth N.D., Jégouzo S.A., Marlor H., Taylor M.E., Drickamer K. // *Molecules*. 2015. V. 20. № 4. P. 6670–6682.
56. Kingeter L.M., Lin X. // *Cell Mol. Immunol.* 2012. V. 9. № 2. P. 105–112.
57. Ishikawa E., Ishikawa T., Morita Y.S., Toyonaga K., Yamada H., Takeuchi O., Kinoshita T., Akira S., Yoshikai Y., Yamasaki S. // *J. Exp. Med.* 2009. V. 206. № 13. P. 2879–2888.
58. Feinberg H., Jégouzo S.A., Rowntree T.J., Guan Y., Brash M.A., Taylor M.E., Weis W.I., Drickamer K. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 40. P. 28457–28465.
59. Bugarcic A., Hitchens K., Beckhouse A.G., Wells C.A., Ashman R.B., Blanchard H. // *Glycobiology*. 2008. V. 18. № 9. P. 679–685.
60. Wells C.A., Salvage-Jones J.A., Li X., Hitchens K., Butcher S., Murray R.Z., Beckhouse A.G., Lo Y.L., Manzanero S., Cobbald C., Schroder K., Ma B., Orr S., Stewart L., Lebus D., Sobieszczuk P., Hume D.A., Stow J., Blanchard H., Ashman R.B. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 11. P. 7404–7413.
61. Yamasaki S. Mincle, as a sensor for damaged cells // *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2009. V. 54. № 8. P. 1125–1259.
62. Kiyotake R., Oh-Hora M., Ishikawa E2, Miyamoto T., Ishibashi T., Yamasaki S. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 42. P. 25322–25332.
63. Balch S.G., McKnight A.J., Seldin M.F., Gordon S. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 29. P. 18656–18664.
64. Arce I., Martínez–Muñoz L., Roda–Navarro P. // *Eur. J. Immunol.* 2004. V. 34. № 1. P. 210–220.
65. Miyake Y., Toyonaga K., Mori D., Kakuta S., Hoshino Y., Oyamada A., Yamada H., Ono K., Suyama M., Iwakura Y., Yoshikai Y., Yamasaki S. // *Immunity*. 2013. V. 38. № 5. P. 1050–1062.
66. Richardson M.B., Williams S.J. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. № 288. P. 1–9.
67. Lobato–Pascual A., Saether P.C., Fossum S., Dissen E., Daws M.R. // *Eur. J. Immunol.* 2013. V. 43. № 12. P. 3167–3174.
68. Graham L.M., Gupta V., Schafer G., Reid D.M., Kimberg M., Dennehy K.M., Hornsell W.G., Guler R., Campanero–Rhodes M.A., Palma A.S., Feizi T., Kim S.K., Sobieszczuk P., Willment J.A., Brown G.D. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 31. P. 25964–25974.
69. Martin B., Hirota K., Cua D.J. // *Immunity*. 2009. V. 31. № 2. P. 21–30.
70. Kerscher B., Wilson G. J., Reid D.M., Taylor J.A., Besra G.S., Yamasaki S., Willment J.A., Brown G.D. // *Eur. J. Immunol.* 2016. V. 46. № 2. P. 381–389.
71. Flornes L.M., Bryceson Y.T., Spurkland A., Lorentzen J.C., Dissen E., Fossum S. // *Immunogenetics*. 2004. V. 56. № 7. P. 506–517.
72. Calabi F., Milstein C. // *Nature*. 1986. V. 323. № 6088. P. 540–543.
73. Salio M., Silk J.D., Yvonne J.E., Cerundolo V. // *Annu. Rev. Immunol.* 2014. V. 32. P. 323–366.
74. Angenieux C., Fraissier V., Maître B., Racine V., van der Wel N., Fricker D., Proamer F., Sachse M., Cazenave J.P., Peters P., Goud B., Hanau D., Sibarita J.B., Salamero J., de la Salle H. // *Traffic*. 2005. V. 6. № 4. P. 286–302.
75. Facciotti F., Cavallari M., Angénieux C., Garcia-Alles L.F., Signorino-Gelo F., Angman L., Gilleron M., Prandi J., Puzo G., Panza L., Xia C., Wang P.G., Dellabona P., Casorati G., Porcelli S.A., de la Salle H., Mori L., De Libero G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 34. P. 14228–14233.
76. Adams E.J. Lipid presentation by human CD1 molecules and the diverse T cell populations that respond to them // *Curr. Opin. Immunol.* 2014. V. 26C. № 1. P. 1–6.
77. Barral D.C., Brenner M.B. // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. V. 7. № 12. P. 929–941.
78. Sugita M., Barral D.C., Brenner M.B. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007. V. 314. P. 143–164.
79. Van Rhijn I., van Berlo, Hilmenyuk T., Cheng T.Y., Wolf B.J., Tatituri R.V., Uldrich A.P., Napolitani G., Cerundolo V., Altman J.D., Willemsen P., Huang S., Rossjohn J., Besra G.S., Brenner M.B., Godfrey D.I., Moody D.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 2. P. 380–385.
80. Moody D.B., Zajonc D.M., Wilson I.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. № 5. P. 387–399.
81. Zajonc D.M., Flajnik M.F. // *Immunogenetics*. 2016. V. 68. № 8. P. 489–490.
82. Gadola S.D., Zaccari N.R., Harlos K., Shepherd D., Castro–Palomino J.C., Ritter G., Schmidt R.R., Jones E.Y., Cerundolo V. // *Nat Immunol.* 2002. V. 3. № 8. P. 721–726.

83. Rossjohn J., Gras S., Miles J.J., Turner S.J., Godfrey D.I., McCluskey J. // *Annu. Rev. Immunol.* 2015. V. 33. № 1. P. 169–200.
84. Li Y., Girardi E., Wang J., Yu E.D., Painter G.F., Kronenberg M., Zajonc D.M. // *J. Exp. Med.* 2010. V. 207. № 11. P. 2383–2393.
85. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. // *Annu. Rev. Immunol.* 2007. V. 25. № 1. P. 297–336.
86. Tilloy F., Treiner E., Park S.H., Garcia C., Lemonnier F., de la Salle H., Bendelac A., Bonneville M., Lantz O. // *J. Exp. Med.* 1999. V. 189. № 12. P. 1907–1921.
87. Beckman E.M., Porcelli S.A., Morita C.T., Behar S.M., Furlong S.T., Brenner M.B. // *Nature.* 1994. V. 372. № 6507. P. 691–594.
88. Layre E., Collmann A., Bastian M., Mariotti S., Czaplicki J., Prandi J., Mori L., Stenger S., De Libero G., Puzo G., Gilleron M. // *Chem. Biol.* 2009. V. 16. № 1. P. 82–92.
89. Ashrafuzzaman M., Tuszynski J. *Membrane Biophysics* / Berlin: Springer-Verlag, 2012. P. 31–48.
90. Ortiz A., Teruel J.A., Manresa Á., Espuny M.J., Aranda A.J. // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011. V. 1808. № 8. P. 2067–2072.
91. Teruel J.A., Ortiz A., Aranda F.J. // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2014. V. 181. № 7. P. 34–39.
92. Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Palacios–Lidón E., Ortiz A. // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007. V. 1768. № 10. P. 2596–2604.
93. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Korshunova I.O., Stukova G.I., Krivoruchko A.V. // *AMB Express.* 2016. V. 6. № 14. P. 1–12.
94. Svenson S. Controlling surfactant self-assembly // *Curr Opin Coll Interface Sci.* 2004. V. 9. № 3. P. 201–212.
95. Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008. V. 1778. № 12. P. 2806–2813.
96. Buckland A.G., Wilton D.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1483. № 2. P. 199–216.
97. Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2009. V. 158. № 1. P. 46–53.
98. Zaragoza A., Aranda F.J., Espuny M.J., Teruel J.A., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. // *Langmuir.* 2010. V. 26. № 11. P. 8567–8572.
99. Zaragoza A.F., Aranda J., Espuny M.J., Teruel J.A. // *Langmuir.* 2009. V. 25. № 14. P. 7892–7898.

Mechanisms of Immunomodulatory and Membranotropic Activities of Trehalolipid Biosurfactants

M. S. Kuyukina^{a, b, *}, O. A. Kochina^a, S. V. Gein^{a, b}, I. B. Ivshina^{a, b}, and V. A. Chereshev^{a, b, c}

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

^b*Perm State University, Perm, 614990 Russia*

^c*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049 Russia*

*e-mail: kuyukina@iegmu.ru

Among glycolipid biosurfactants, trehalolipids synthesized by *Rhodococcus* actinobacteria are intensively studied for possible biomedical applications because of their lower toxicity compared to mycobacterial trehalose di- and monomicolates. The immunomodulatory activity of trehalolipids is realized through their interaction with the membrane receptors of immune cells, which triggers a signaling system to activate the production of cytokines, reactive oxygen species, and antibodies. Due to the amphiphilic nature, trehalolipids affect the lipid bilayer of cell membranes, changing its permeability. The considered molecular mechanisms of trehalolipid interactions with immune cells are important for the development of new immunotherapy approaches.

Keywords: biosurfactants, glycolipids, *Rhodococcus*, cytokines, immunomodulatory activity, membranotropic action

УДК 582.284.51:577.115

ГРИБЫ РОДА *Alternaria* КАК ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И БИОГЕРБИЦИДОВ (ОБЗОР)

© 2020 г. А. А. Далинова¹, Д. Р. Салимова¹, А. О. Берестецкий^{1, *}

¹ВНИИ защиты растений, С.-Петербург, 196608 Россия

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Поступила в редакцию 03.03.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

За последние несколько десятилетий было описано свыше 300 метаболитов грибов рода *Alternaria*, многие из которых проявляют биологическую активность по отношению к растениям, бактериям, грибам и простейшим. В обзоре обобщены современные данные о структуре, биологической активности и возможностях практического применения в защите растений, фармакологии и хемосистематике вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria*. Некоторые виды грибов этого рода, поражающие сорные растения, были предложены в качестве продуцентов биогербицидов. Затронуты токсикологические аспекты применения грибов рода *Alternaria* в качестве биогербицидов.

Ключевые слова: *Alternaria*, вторичные метаболиты, фитотоксины, микогербициды

DOI: 10.31857/S0555109920030022

Анаморфный род грибов *Alternaria* относится к семейству *Pleosporaceae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes* и *Ascomycota*). Отличительным признаком грибов этого рода является образование крупных, многоклеточных темноокрашенных конидий с поперечными и продольными перегородками. Систематика грибов рода *Alternaria* — предмет постоянных научных дискуссий и регулярно пересматривается. В настоящее время род насчитывает более 350 видов. Его делят на две условные группы — мелко- и крупноспоровых видов, которые, в свою очередь, с использованием морфологического и молекулярно-филогенетического подходов разделены на несколько секций [1–3].

Экологическое и практическое значение грибов рода *Alternaria* очень велико. Многие виды являются сапротрофами и развиваются на разнообразных органических субстратах и наряду с другими микроорганизмами принимают участие в разложении и минерализации растительных остатков. Однако большинство представителей рода *Alternaria* (*A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. solani*, *A. porri* и др.) вызывают болезни растений, а для ряда сельскохозяйственных культур являются одними из самых вредоносных. Как правило, грибы этого рода поражают листья, но могут также поражать семена и плоды [4]. Некоторые представители *Alternaria* spp. охарактеризованы как эндофиты. Ряд видов грибов этого рода, поражающие сорные растения, были предложены в качестве продуцентов биогербицидов [5–8].

За последние несколько десятилетий были описаны свыше 300 вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria*, многие из которых проявляют биологическую активность по отношению к растениям, бактериям, грибам и простейшим. Эти метаболиты относятся ко всем классам природных соединений [9, 10]. Фитопатогенные представители рода *Alternaria* известны своей способностью продуцировать специфичные и неспецифичные фитотоксины [4]. Вторичные метаболиты микроскопических грибов, в частности, грибов рода *Alternaria*, могут служить основой для разработки новых пестицидов или лекарственных средств [11]. С другой стороны, грибы рода *Alternaria*, как сапротрофы, так и патогены сельскохозяйственных культур, продуцируют микотоксины — контаминанты пищевых продуктов [12].

В представленном материале обобщены современные данные о структуре, биологической активности и возможностях практического использования вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* в защите растений, фармакологии и хемосистематике. Затронуты также токсикологические аспекты применения грибов рода *Alternaria* в качестве продуцентов биогербицидов.

Микотоксины. Некоторые мелкоспоровые виды рода *Alternaria* входят в комплексы микромицетов, развивающиеся на сельскохозяйственной продукции при хранении. Со второй половины XX в. активно изучается возможное токсическое действие метаболитов альтернариоидных микро-

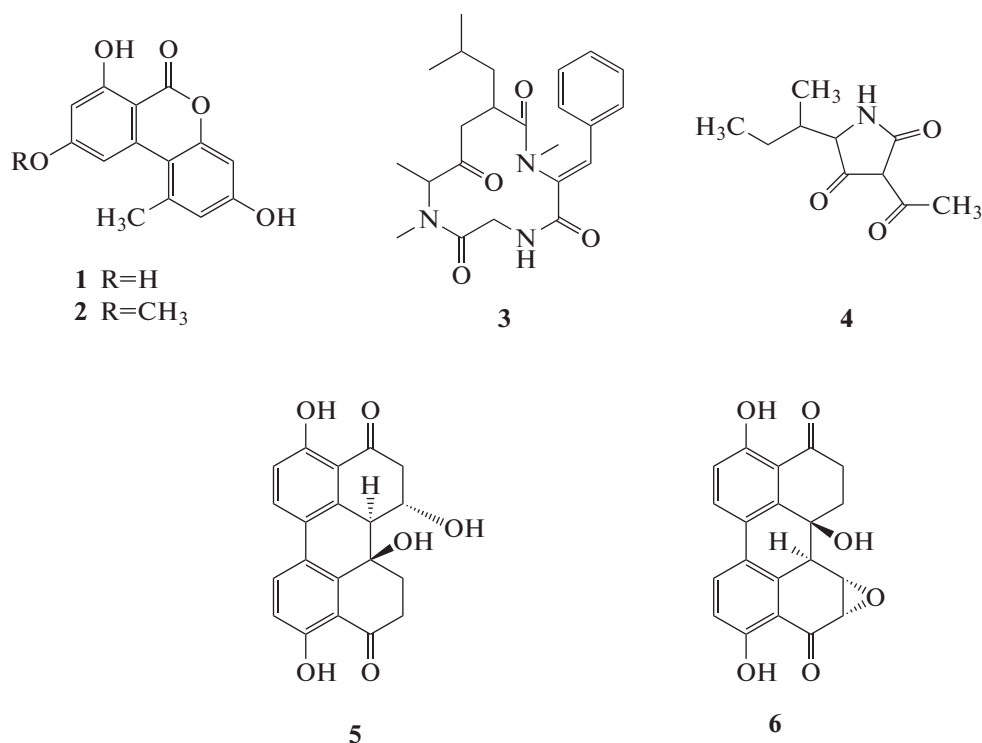


Рис. 1. Микотоксины грибов рода *Alternaria*: **1** — альтерналиол, **2** — метиловый эфир альтерналиола, **3** — тентоксин, **4** — тенуазоновая кислота, **5** — альтертоксин I, **6** — альтертоксин II.

мицетов на здоровье человека и животных [13, 14]. Из потенциально токсичных метаболитов грибов этого рода наиболее распространенными контаминантами пищевых продуктов являются альтерналиол (АОЛ) и его метиловый эфир (АМЭ), тентоксин (ТТ), тенуазоновая кислота (ТеК) и альтертоксины I, II и III (рис. 1) [13, 15, 16]. Производные дибензопиранона — АОЛ и АМЭ — являются наиболее характерными метаболитами грибов рода *Alternaria*, их образуют как крупноспоровые виды (*A. solani*, *A. porri*, *A. dauci* и др.), так и мелкоспоровые (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* и др.) [16–19]. Производное тетрамовой кислоты, ТеК, и периленхиноновые производные, альтертоксины I, II и III, образуют преимущественно мелкоспоровые виды *Alternaria* [16].

Современные исследования микотоксинов грибов рода *Alternaria* охватывают несколько основных направлений, включающих оценку возможных токсических эффектов микотоксинов *in vitro* и *in vivo*, разработку чувствительных методов обнаружения микотоксинов (в том числе “замаскированных” — конъюгированных), скрининг различных образцов кормов и пищевых продуктов на содержание основных микотоксинов и их производных, а также изучение стабильности микотоксинов в процессе переработки фруктов, овощей и зерновых продуктов.

Среди основных микотоксинов грибов рода *Alternaria* только ТеК проявляет выраженную острую токсичность: ЛД₅₀ для куриных эмбрионов составляет 548 мкг/яйцо [20], для крыс — 168 мг/кг, собак — 2.5–10 мг/кг [21]. Токсичность АОЛ и его производных, а также альтертоксинов, по-видимому, заключается в развитии отдаленных эффектов: генотоксичности, канцерогенности и др. [22, 23]. Так, в опытах *in vitro* показано, что АОЛ и его метиловый эфир способны активировать онкогены в клетках эпителия кишечника человека [24], ингибировать топоизомеразы I и IIα [25, 26], вызывать мутации в клетках фибробластов китайского хомячка V79 [22]. На линиях клеток Сасо-2 было показано, что АОЛ в суб-цитотоксичных концентрациях (15–60 мкМ) вызывает нарушения клеточного цикла и изменяет мембранный потенциал митохондрий. Это является, очевидно, следствием генотоксичности микотоксина и приводит к апоптозу и некрозу клеток [27]. АОЛ и АМЭ подавляли индукцию клеточного иммунитета на культурах макрофагов мыши и легочного эпителия человека в концентрации 10 мкМ [28]. В опытах *in vitro* было показано, что АМЭ и АОЛ в концентрациях 2.5–10 мкМ проявляют микоэстрогенные свойства. АОЛ также ингибировал метаболическую активность и пролиферацию гранулезных клеток свиней, что в совокупности с его микоэстрогенными свойствами может негативно

влиять на репродуктивные циклы у свиней и других млекопитающих [29, 30].

Минорные микотоксины грибов рода *Alternaria* — альтертоксина I, II и III — обладают генотоксическими и мутагенными свойствами [31–34]. Показано, что цитотоксическая активность альтертоксина II на культурах клеток китайского хомячка и человека проявляется при его концентрации 0.1–1.0 мкМ, что на порядок ниже, чем для альтертоксинов I и III [13, 35]. В то же время наибольшую мутагенную активность в тесте Эймса на бактерии *Salmonella typhimurium* продемонстрировал альтертоксин III: его мутагенный потенциал был всего в 10 раз ниже, чем у афлатоксина B1 [31]. Кратковременное (1 ч) воздействие 10 мкМ альтертоксина II вызывало гибель клеток эпителия кишечника, причем эффект токсина усугублялся при одновременном воздействии на клетки деформации сдвига в качестве стрессового фактора [34].

Содержание микотоксинов грибов рода *Alternaria* в кормах и продуктах питания не регламентировано нормативными документами, как в России, так и в других странах мира. Так, ПДК для АОЛ, АМЕ и ТеК не установлены [36, 37]. В 2011 г. Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA) была предпринята попытка оценить уровень опасности микотоксинов грибов рода *Alternaria* для здоровья человека и животных на международном уровне [38]. Среднее количество АОЛ и АМЕ, поступающих в организм человека с пищей (зерно, овощи, фрукты и продукты их переработки) составляет около 2.5 нг/кг массы тела в день, ТеК и ТТ — 1.5 нг/кг [38].

Во многом отсутствие нормативных документов, регламентирующих содержание микотоксинов *Alternaria* spp. в продуктах питания и кормах, связано с недостатком информации о токсичности этих веществ *in vivo*. В исследовании с участием добровольцев показано, что 90% ТеК выводится из организма с мочой в течение 24 ч [39]. В рамках изучения токсикокинетики АОЛ была показана его способность связываться с сывороточным альбумином [40]. В тестах *in vivo* на мышах АОЛ практически полностью выводился из организма с фекальными массами и мочой и не проявлял системной генотоксичности [41]. Тем не менее, связь между опухолевыми заболеваниями человека и контаминацией продуктов питания токсинообразующими грибами рода *Alternaria* может быть прослежена [42].

Мелкоспоровые *Alternaria* spp. из секции *tenuissima* могут одновременно образовывать до 15 микотоксинов, концентрация которых может сильно варьировать. Авторы [43] предположили, что микотоксины могут действовать синергетически. Например, АОЛ *in vitro* существенно усиливал эстрогенный эффект зеараленона — токсина

некоторых видов рода *Fusarium*. В то же время при изучении комбинированного воздействия АОЛ и альтертоксина II *in vitro* было показано, что на культурах клеток печени человека HepG2 и аденокарциномы кишечника HT29 АОЛ и альтертоксин II в различных соотношениях проявляют преимущественно аддитивный эффект [44].

Хроматографические методы являются рутинными для количественного определения стандартного набора микотоксинов (АОЛ, АМЕ, ТТ, ТеК и др.) мелкоспоровых альтернаний. В настоящее время разработаны и валидированы высокочувствительные ВЭЖХ-МС методы определения этих и других микотоксинов, включающие простые методики экстракции [45, 46], которые описаны в работах [47, 48] на примере микотоксинов плесневых грибов. Разработана методика определения ТеК в моче при помощи метода разведений растворов стабильного изотопа (SIDA), позволяющая определять микотоксин в диапазоне концентраций 1–100 мкг/л [39].

В последнее время большой интерес вызывают, так называемые, конъюгированные (модифицированные, метаболизированные) микотоксины, включающие гликозиды, серосодержащие и другие их производные. В начале 2000-х годов начаты исследования модифицированных токсинов грибов из родов *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium* [49]. Конъюгированные токсины *Alternaria* spp. изучаются недавно. Однако обнаружено, что они образуются в чистой культуре, в организме животных и в растениях. Так, АОЛ-3-сульфат и АМЕ-3-сульфат были найдены в коммерческих образцах томатов [50], в моче и кале крыс [51].

Микотоксины *Alternaria* spp. обнаруживаются в большинстве образцов различных сельскохозяйственных культур (томатах, яблоках, пшенице, овсе и др.) и продуктах их переработки (пюре, кетчупе, вине, подсолнечном масле и кормовых ингредиентах) [36, 52–55]. В образцах кормов и кормового сырья российского производства, проанализированных в 2014–2016 гг., доминировали такие токсины грибов рода *Alternaria*, как ТеК (41% от общего числа образцов), ТТ (30%), АОЛ (16%) и АМЕ (10%) [56]. Обнаружено накопление ТеК в плодах винограда в зависимости от его сорта на уровне от 0 до 780 мкг/кг [57]. В работе [58] после анализа 129 образцов фруктовых и овощных соков, а также продуктов переработки томатов было сделано заключение, что ТеК не представляет такой большой опасности для здоровья человека, как АОЛ и АМЕ, обнаруженные в 100% образцов. Содержание АОЛ, АМЕ, альтенуена и ТеК в пшенице может достигать уровня 6, 17, 3 и 0.8 мг/кг зерна соответственно [59]. При помощи метода ВЭЖХ/МС-МС с применением изотопно-меченого внутреннего стандарта изучено накопление микотоксинов в продуктах для

детского питания. Наиболее часто в крупах и томатном соке встречалась ТеК. При этом в ряде образцов томатного сока содержание этого токсина было около 0.5 мг/кг [37]. В интактных плодах томатов альтертоксин II быстро метаболизируется растительными ферментами, в то время как в томатной пасте его разрушение идет более медленно (в течение 1 сут выявляется около 50% от внесенного вещества), которое, однако, ускоряется при термальной обработке (выход около 2–4% через 24 ч после обработки) [60].

К микотоксинам можно отнести и другие малоизученные метаболиты *Alternaria* spp. Так, *A. oxytropis* — эндофит бобовых из родов *Astragalus* и *Oxytropis* — продуцирует алкалоид сваинсонин, который отвечает за токсикозы домашних животных, питающихся пораженными растениями. Этот токсин обнаружен также у энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae*, его молекулярной мишенью является маннозидаза [61]. Токсикологические свойства большинства метаболитов видов рода *Alternaria* изучены слабо. В частности, к микотоксинам потенциально могут быть отнесены дикетопиперазины (например, рассмотренный ниже макулозин), обнаруженные у *Alternaria* spp., поскольку многие известные представители этого класса природных соединений проявляют токсигенные свойства [62].

Фитотоксины. Грибы рода *Alternaria*, вызывающие болезни растений, по типу питания, как правило, являются некротрофными патогенами, для которых характерно образование фитотоксинов (ФТ) в области инфекции. Исследования их химической структуры, функций, молекулярных мишеней и особенностей образования *in vitro* и *in vivo* могут способствовать лучшему пониманию инфекционного процесса и, следовательно, разработке рациональных способов борьбы с альтернариозами.

Большинство ФТ грибов рода *Alternaria* являются неспецифичными (неселективными), поскольку к ним чувствителен широкий круг растений из различных семейств [63]. Более того, многие из ФТ демонстрируют и другие типы биологической активности, в том числе, антимикробную, инсектицидную и цитотоксическую [9]. Образование таких ФТ не является необходимым условием для успешной колонизации растения-хозяина, но в то же время усиливает проявление симптомов заражения [64] и, возможно, повышает шансы на выживание в конкурентной борьбе за субстрат с другими микро- и макроорганизмами [65]. Хозяин-специфичные ФТ (ХСТ), к которым высоко чувствительны только определенные генотипы культурных или сорных растений, известны пока только для некоторых патотипов *A. alternata* [66, 67]. Как правило ХСТ являются факторами патогенности, их образование является необходимым

условием для успешной колонизации хозяина [68–70].

ХСТ *A. alternata* разнообразны по структуре. Так, АМ-токсин патотипа *A. alternata*, вызывающего пятнистость листьев яблони (рис. 2, 1), представляет собой циклический нерибосомальный тетрапептид [71]. Токсины патотипов *A. alternata*, поражающих грушу, землянику и мандарин (АК-, АФ- и АСТ-токсины соответственно), имеют в своей структуре один и тот же фрагмент — эпокси-декатриеновую кислоту (рис. 2, 2–4) [72–74]. АСRL-токсин патотипа *A. alternata*, поражающего лимон, является поликетидом (рис. 2.5) и содержит в своей структуре многоатомный спирт и дигидропириновое кольцо [75]. ААL-токсины патогена томата *A. alternata* f. sp. *lycopersici* представляют собой эфиры аминокпентола и являются структурными аналогами сфинганина и сфингозина (рис. 2, 6) [76].

В настоящее время для большинства ХСТ известны клеточные мишени. Структурно схожие АК-, АФ- и АСТ-токсины вызывают дисфункцию мембран, которая приводит к утечке электролитов, в первую очередь ионов K^+ , уже в первые минуты после обработки этими токсинами [74]. В результате воздействия АСR-токсина в клетках чувствительных сортов растений, происходит окислительное фосфорилирование, потеря мембранного потенциала митохондрий и утечка кофактора NAD^+ . Чувствительность определенных сортов лимона к действию АСR-токсина обусловлена посттранскрипционной модификацией митохондриального гена tРНК-Ала, которая в растительных клетках приводит к синтезу предположительно порообразующего олигомерного белка [77].

Гены биосинтеза большинства ХСТ *A. alternata* находятся на дополнительных хромосомах, наличие которых в геноме не является необходимым для нормальной жизнедеятельности гриба. Межвидовая передача таких хромосом может осуществляться в процессе парасексуального цикла через анастомозы [67]. “Возникновение” патотипов *A. alternata*, вероятно, обусловлено внедрением сортов растений, обладающих молекулярной мишенью для конститутивных или индуцибельных метаболитов этого гриба или изолятов, несущих указанные выше хромосомы. Однако данных по встречаемости ХСТ-образующих альтернариев недостаточно, чтобы определить степень опасности этих ФТ.

В России был отмечен альтернариоз листьев яблони, однако выявить штаммы *A. alternata* (или *A. mali*), образующие АМ-токсин, не удалось [78]. ВЭЖХ/МС-МС анализ ряда ХСТ (АСТG-С, D, E и F, АК-токсин II) в изолятах возбудителей альтернариоза листьев цитрусовых Бразилии (тангора и лайма) позволил выявить ХСТ-образующие

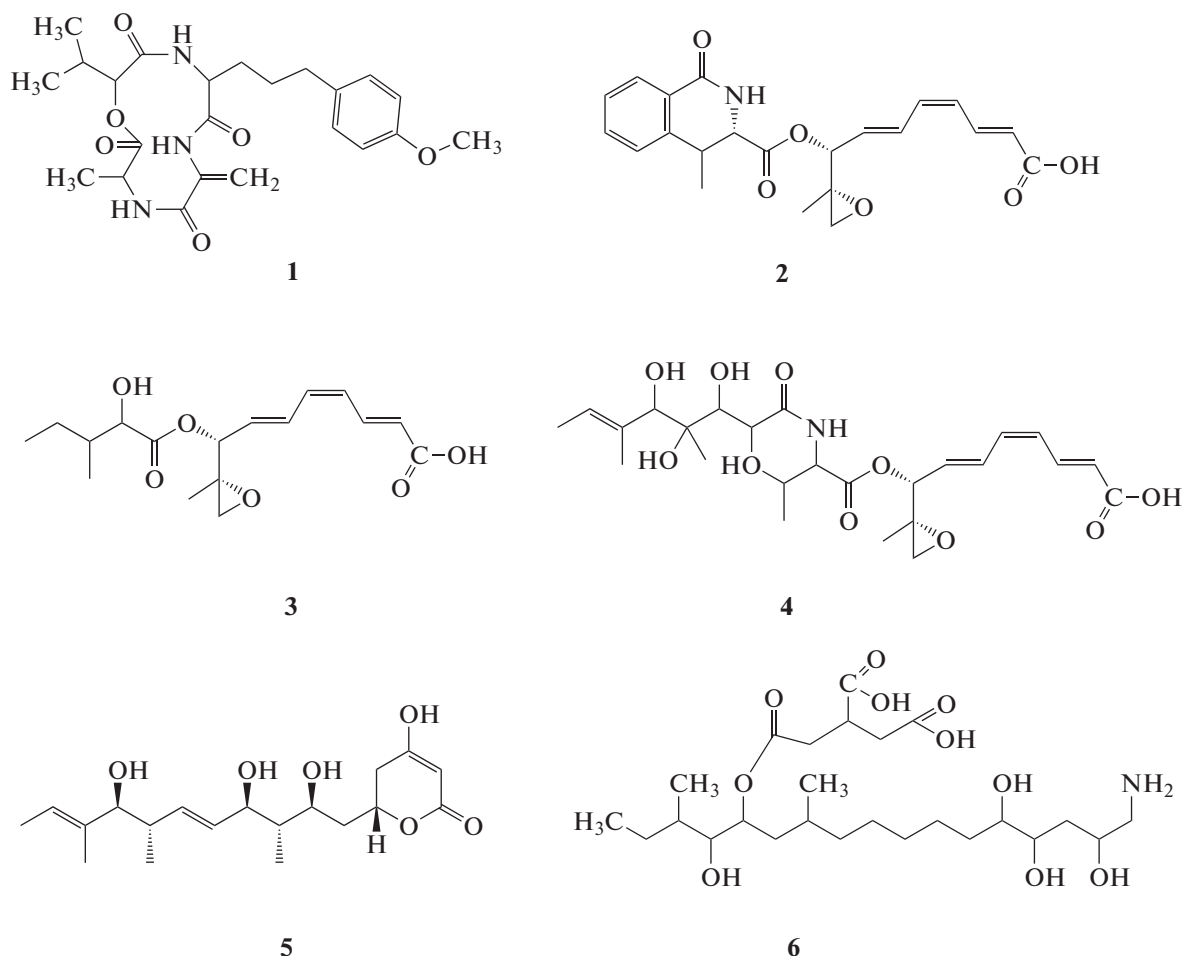


Рис. 2. Хозяиноспецифичные фитотоксины грибов рода *Alternaria*: 1 — АМ-токсин, 2 — АК-токсин, 3 — АФ-токсин, 4 — АСТ-токсин, 5 — АСРЛ-токсин, 6 — ААЛ-токсин.

A. alternata. При этом они образовывали АОЛ, АМЭ, альтенузин, альтенуен и альтертоксин I [79]. При анализе метаболитов *A. alternata*, выделенных из citrusовых, собранных в Италии и Испании, были обнаружены типичные токсины этого гриба (АОЛ, АМЭ, альтенуен и ТеК). У наиболее патогенных изолятов выявили наличие гена, отвечающего за биосинтез ХСТ АСТ-токсина [80].

Подробную информацию о ХСТ *A. alternata* можно найти в специально посвященных им обзорах [67, 81]. Свойства некоторых других ХСТ (макулозина и ААЛ-токсина) будут рассмотрены ниже. В качестве примеров неспецифических ФТ будут приведены некоторые метаболиты возбудителей альтернариозов пасленовых и крестоцветных культур.

Крупноспоровый вид *A. solani* является возбудителем сухой пятнистости листьев картофеля и томатов. Из культур этого гриба было выделено несколько неселективных ФТ. Так, из фильтрата культуральной жидкости *A. solani*, выращенной на среде Чапека-Докса, была выделена альтернари-

вая кислота (АК) (рис. 3, 1) [82]. Ее фитотоксическое действие на отсеченных побегах картофеля и томата выражалось в некротических повреждениях стебля и листьев, схожих по внешнему виду с симптомами заражения *A. solani* в природе. В биотесте на отсеченных побегах фитотоксическое действие проявлялось по отношению к растениям различных семейств — томату, гороху, свекле, редису, горчице, капусте и моркови [82]. В тесте на надколотых листовых дисках чувствительными к АК оказались только растения семейства пасленовых — томат, картофель и табак [83]. АК образуется как на искусственных питательных средах, так и в пораженных плодах томата, причем не только в очаге поражения грибом, но и в “отдаленных” их участках [84]. Обработка АК в концентрации 50–200 мкМ срезов клубней картофеля, устойчивого к фитофторозу, вызывала задержку в проявлении иммунной реакции при заражении *Phytophthora infestans*. Таким образом, АК может играть роль иммуносупрессора в патогенезе *A. solani* и других грибов [85]. На это также ука-

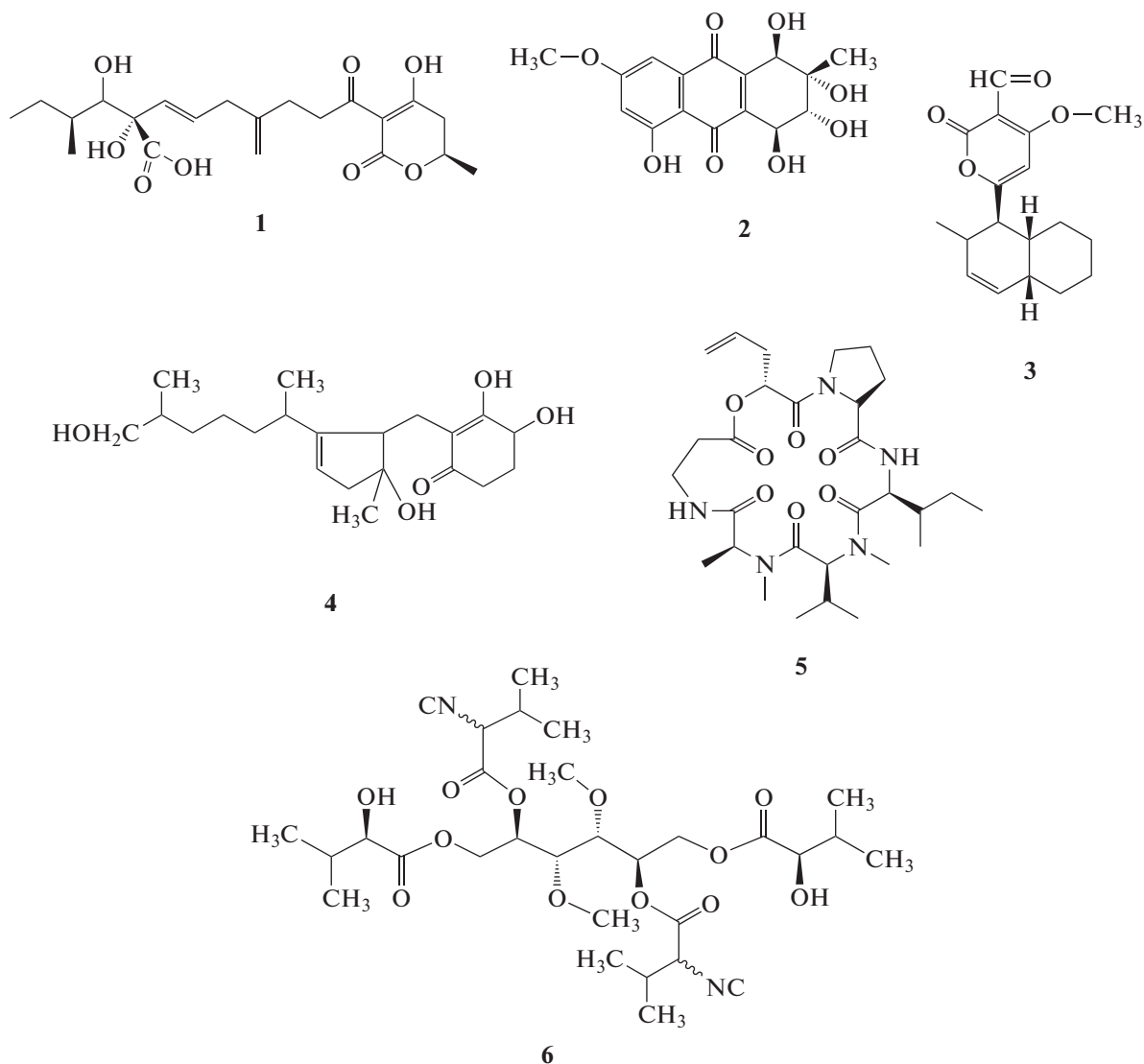


Рис. 3. Неспецифические фитотоксины грибов рода *Alternaria*: 1 — альтернариевая кислота, 2 — альтерсоланол А, 3 — соланапирон А, 4 — бициклоальтернарен 1, 5 — деструксин В, 6 — брассициколин А.

зывает тот факт, что заражение листьев томатов *A. solani* благоприятствует их заселению слабопатогенными мелкоспоровыми альтернариями [86].

Из культуральной жидкости *A. solani* был выделен антрахиноновый пигмент, альтерсоланол А (рис. 3, 2) [87]. Этот ФТ и его аналоги были найдены и у других грибов, в частности, *A. porri*, *Dactylaria lutea* и *Phomopsis juniperovora*. Альтерсоланол А ингибировал рост проростков салата и лука-батун (Allium fistulosum). Механизм его действия заключается в ингибировании клеточного дыхания [88]. При культивировании на картофельно-глюкозной среде *A. solani* продуцировал соланапироны А-Е (рис. 3, 3) [89]. Эти соединения были обнаружены также у патогена нута *Ascochyta rabiei* и ряда других грибов, причем предполагали, что образование соланапиранов является фактором

вирулентности у *A. rabiei*. Однако эти токсины не детектировались в пораженных тканях нута [90]. Мутантные штаммы *A. rabiei* и *A. solani*, неспособные к биосинтезу соланапиранов, не демонстрируют снижения вирулентности на растениях-хозяевах. Таким образом, образование соланапиранов, по-видимому, не является обязательным фактором для успешной колонизации их продуцентами растений-хозяев [91].

У различных возбудителей альтернариозов крестоцветных известны ФТ различной химической природы. Из культурального фильтрата патогена китайской капусты *A. alternata*, полученного на модифицированной среде Ричарда с добавлением картофельного крахмала, было выделено 11 соединений терпеноидной природы — би- и трициклоальтернаренов (рис. 3, 4). Следует отметить, что

среди них два соединения оказались идентичны известным ранее АСТГ-токсинам, выделенным из патотипа *A. alternata*, поражающего лимон (рис. 3, 4). Таким образом, АСТГ-токсины можно считать скорее селективными, чем строго специфичными [92]. Бициклоальтернарен II в концентрации 0.1 мМ подавлял рост ряски многокоренника [93].

При культивировании на среде V8 патоген рапса *A. brassicae* продуцировал несколько фитотоксичных циклодепептидов, среди которых основным фитотоксичным компонентом был деструксин В (ДБ) (рис. 3, 5). Этот ФТ в концентрации 50–100 мкг/мл вызывает хлорозы на листьях рапса, а у растений других семейств – в концентрации 250–500 мкг/мл [94, 95]. Среди деструксинов наибольшую фитотоксичность проявлял гомодеструксин В [96]. Следует отметить, что деструксины, включая ДБ, также являются метаболитами некоторых хорошо известных энтомопатогенных грибов *Metarhizium anisopliae* и *Lecanicillium longisporum* [97, 98]. ДБ обнаруживается как в прорастающих конидиях *A. brassicae*, так и в растениях, зараженных грибом. Этот ФТ активно метаболизируется в листьях крестоцветных растений, а также индуцирует в них образование антимикробных метаболитов [99]. Совместная обработка растений ДБ и конидиями сапротрофного изолята *A. alternata* не приводила к возникновению заболевания, как это происходило при комбинации этого гриба с некоторыми другими ХСТ [95]. Таким образом, роль ДБ в заражении растений его продуцентом остается неясной.

Основной низкомолекулярный ФТ *A. brassicicola*, брассициколин А, который образуется при культивировании гриба на различных жидких питательных средах, но лучше всего – на картофельно-декстрозной жидкой среде и на средах, бедных азотом (рис. 3, 6). Этот ФТ содержит в структуре редкую для природных соединений изоцианидную группу и проявляет в концентрации 5 мМ фитотоксическую активность на листьях растений рода *Brassica*, стимулирует образование фитоалексинов растениями, а также обладает антимикробными свойствами [100–102].

Необходимо также отметить фитотоксические свойства часто встречающихся микотоксинов. Уже упомянутые микотоксины грибов рода *Alternaria*, ТеК, АОЛ и АМЭ, проявляют неспецифические фитотоксические свойства [103]. Высказано предположение, что АОЛ, а также его производные могут играть роль в патогенности грибов рода *Alternaria*, хотя они обладают более низкой фитотоксичностью, чем ТеК. Мутанты по гену поликетидсинтазы *pksI*, неспособные к синтезу пула пиронов (АОЛ, АМЭ, альтенузина и альтенуена), обладали пониженной патогенностью по сравнению со штаммами дикого типа. При гете-

рологической экспрессии гена *pksI* в *Aspergillus oryzae* образовывалось достаточное количество АОЛ [104]. Биосинтез ТеК осуществлялся из изолейцина и ацетил-КоА при действии ТеА-синтетазы I [105]. Возможно, получение ТеК⁻мутантов позволит определить роль и этого токсина в развитии мелкоспоровых альтернаний на растениях.

Фитотоксины *Alternaria* spp. могут быть использованы в качестве селективного фактора для отбора нечувствительных к ним генотипов культурных растений [106–108]. Так, в патенте РФ № 2066347 [109] был описан способ получения токсинов гриба *A. solani* для применения в качестве компонента селективных сред в селекции устойчивых к альтернариозу сортов томата и картофеля. Клеточные линии генотипа моркови, устойчивого к альтернариозу (возбудитель *A. dauci*), оказались менее чувствительны по отношению к недавно выделенному фитотоксину, адулактону, чем клеточные линии, полученные из восприимчивого к заболеванию генотипа [110]. ТТ нашел применение в биотехнологии растений для определения жизнеспособности и функционирования хлоропластов у гибридов *Nicotiana* spp. [111].

Продуценты микогербицидов. Фитопатогенные микроорганизмы, поражающие сорные растения, могут быть использованы в качестве биогербицидов. Они должны отвечать следующим основным требованиям: эффективность в полевых условиях, технологичность и безопасность, как для защищаемых культур, так и для полезных организмов и человека. Внесение фитопатогенов в агрофитоценоз проводится той же аппаратурой, что используется и для применения химических гербицидов. При благоприятных условиях это приводит к развитию сильной локальной эпифитотии в популяции сорного растения в течение одного сезона вегетации [112]. Грибы рода *Alternaria*, вызывающие заболевания сорных растений, часто рассматривались или были запатентованы в качестве основы для биогербицидов. Их примеры приведены в таблице 1. Некоторые из них были зарегистрированы для применения в США (Casst[™] и Smolder[™]), а препарат Myco-herb® на основе *A. chlamidosporiformans* (*Lewia chlamidosporiformans*) проходил предрегистрационные испытания в Бразилии. Однако внедрения их в практику не произошло [113]. Причины этого могут быть различные. Прежде всего, нестабильная эффективность в полевых условиях, а также возможные проблемы с получением больших объемов инокулята при помощи твердофазной ферментации и высушивания конидий *Alternaria* spp., что является стандартным процессом стабилизации инокулята грибов-продуцентов биопестицидов [114].

Препарат Casst на основе конидий *A. cassia* для борьбы с сенной туполистной (*Senna obtusifolia*) и

Таблица 1. Виды рода *Alternaria*, перспективные для разработки биогербицидов

Вид	Целевой объект	Источник
<i>Alternaria</i> sp.	Чертополох мелкоголовчатый (<i>Carduus pycnocephalus</i>)	[115]
<i>A. alternata</i>	Щирица запрокинутая (<i>Amaranthus retroflexus</i>)	[116]
<i>A. alternata</i>	Лантана сводчатая (<i>Lantana camara</i>)	[117]
<i>A. alternata</i>	Ежовник (<i>Echinochloa</i> spp.)	[118]
<i>A. alternata</i>	Водный гиацинт (<i>Eichhornia crassipes</i>)	[119]
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>sphenocleae</i>	Сфеноклея цейлонская (<i>Sphenoclea zeylanica</i>)	[120]
<i>A. cassiae</i>	Сенна туполистная (<i>Cassia obtusifolia</i>), сенна западная (<i>Cassia occidentalis</i>), кроталария нарядная (<i>Crotalaria spectabilis</i>)	[5]
<i>A. cirsinioxia</i>	Бодяк полевой (<i>Cirsium arvense</i>)	[7, 121, 122]
<i>A. destruens</i>	Повилика (<i>Cuscuta</i> spp.)	[123]
<i>A. euphorbiicola</i>	Молочай разнолистный (<i>Euphorbia heterophylla</i>)	[124]
<i>A. eichhorniae</i>	Водный гиацинт (<i>Eichhornia crassipes</i>)	[6]
<i>A. macrospora</i>	Партениум позднеспелый (<i>Parthenium hysterophorus</i>)	[8]
<i>A. macrospora</i>	Анода гребенчатая (<i>Anoda cristata</i>)	[125]
<i>A. sonchi</i>	Осот полевой (<i>Sonchus arvensis</i>)	[126]
<i>A. zinniae</i>	Чертополох (<i>Carduus pycnocephalus</i>)	[127]

кроталарией нарядной (*Crotalaria spectabilis*) был зарегистрирован в 1980 гг. [5]. Описана биогербицидная композиция на основе нефитотоксичного растительного масла, прилипателя и конидий этого гриба, которую можно использовать при помощи стандартного распылительного оборудования [128]. Для повышения эффективности биогербицида на основе *A. cassiae* были разработаны способы совместного применения конидий гриба с такими химическими гербицидами, как глифосат, 2,4-Д и лактофен [129].

Разработан состав микогербицида против повилики (*Cuscuta* spp.) на основе смеси конидий *Alternaria* sp. и *Fusarium tricinctum* в 0.05%-м растворе Твин-20. Испытания этой композиции были проведены на плантациях клюквы с высокой естественной засоренностью повиликой. Препарат снизил численность повилики на 90% через 24 сут после обработки [130]. Эффективность *A. destruens* против повилики, паразитирующей на цитрусовых, удалось повысить за счет совместного применения композиции, состоящей из конидий гриба (18 млрд конидий/л), растительного масла (7.5%), фитотоксичного прилипателя сульфата аммония (0.125%) и гербицида глифосата (20 г действующего вещества/л). Эта смесь была эффективной в полевых условиях, вызывая гибель паразитического растения через 5 нед. после обработки и не затрагивая лимонные деревья [123].

Некоторые виды *Alternaria* spp. вирулентны при заражении растений мицелием или его видоизменениями, что важно при плохой споруляции. Так, для *A. chlamidosporiformans* — продуцента ми-

когербицида против молочая разнолистного (*Euphorbia heterophylla*) были подобраны условия получения хламидоспор на жидкой питательной среде, содержащей 30 г сахарозы, 20 г дрожжевого экстракта и 4 мл Твин-80. Среда имела pH 6.9–7.0, а температура инкубации составляла 25–30°C и скорость перемешивания 150 об./мин. Замена сахарозы на коричневый сахар позволила снизить расход дрожжевого экстракта в 2 раза без потери выхода продукта [124].

Из культур ряда возбудителей альтернариозов сорных растений выделены и охарактеризованы фитотоксины, которые могут быть использованы для создания гербицидных композиций или как маркеры для селекции высокопатогенных штаммов. Например, фитотоксичный периленин альтейхин выделен у патогена водного гиацинта *A. eichhorniae* [131]. У другого патогена этого растения (*A. crassipies*) неидентифицированный фитотоксин предложен в качестве одного из компонентов микогербицида [132]. Фильтрат культуральной жидкости *A. alternata* LC# 508, основным компонентом которого является ТеК, может быть дополнительным в составе микогербицида для борьбы с лантаной сводчатой [133]. Из культуральной жидкости патогена бодяка полевого *A. cirsinioxia*, полученного на глюкозно-аспарагиновой среде, был выделен цинниол — известный фитотоксин грибов рода *Alternaria* (*A. tagetica*, *A. zinniae*, *A. porri* и др.) [134]. Недавно в твердофазной культуре патогена осота полевого *A. sonchi* были обнаружены фитотоксичные хлоромонилиновые кислоты В–D, известные у фитопато-

генных грибов *Monilinia fruticola* и *Cochliobolus australiensis* [10, 135, 136]. Из культуры возбудителя пятнистости молочая разнолистного *A. euphorbii-cola* выделены ангидромевалонолактон, тирозол и циклоглицилпролин, обладающие фитотоксическими свойствами [137]. Однако роль этих и многих других фитотоксинов в патогенезе еще не изучена.

При разработке биогербицидов на основе грибов рода *Alternaria* необходимо учитывать и риски их применения — токсигенные и аллергенные свойства грибов этого рода. Известно, например, что гриб *A. alternata* накапливает АОЛ в конидиях [138], в их оболочке обнаружены аллергенные белки Alt a1-a15 с молекулярной массой от 11 до 58 кДа [139]. Однако информация о токсигенных и аллергенных свойствах большинства возбудителей альтернариозов культурных и сорных растений практически отсутствует. В связи с этим для продуцентов биогербицидов, включая возбудителей альтернариозов, предложено: 1) разрабатывать методики определения остаточных количеств токсичных и гербицидных метаболитов, 2) подбирать такие способы применения биогербицидов, которые исключают попадание токсинов в корма и продукты питания, 3) вести отбор штаммов, не продуцирующих микотоксины [140]. Для достижения этой цели безусловно будут полезны вышеописанные разработки для анализа микотоксинов и ХСТ мелкоспоровых *Alternaria* spp.

Прообразы действующих веществ химических пестицидов. Природные биологически активные соединения, включая вторичные метаболиты грибов, широко используются в качестве прообразов действующих веществ пестицидов. Так, в 2016 г. продажи инсектицидов на основе природных соединений или их синтетических аналогов составляли 73%, фунгицидов — 61%, гербицидов — 39% от общего числа средств защиты растений. Многие природные соединения обладают оригинальными механизмами действия и благодаря этому могут быть использованы для борьбы с популяциями вредных организмов (фитофагов, фитопатогенов, сорных растений), резистентных к традиционным химическим пестицидам [141–143].

ТеК и ее синтетические производные рассматривались как потенциальные инсектицидные соединения. ТеК проявила ларвицидную активность по отношению к гусеницам первого возраста *Lucilia sericata* (ЛД₅₀ 120 мкг/мл), но не была активна по отношению к другим тестируемым насекомым из различных отрядов: *Drosophila melanogaster*, *Sitophilus granarius*, *Aphis fabae* и *Tetranychus urticae*. Некоторые производные ТеК (с двумя фенильными группами и хлором при 4-м атоме углерода) проявили повышенную активность по отношению к некоторым упомянутым членистоногим,

например, *L. sericata* (ЛД₅₀ 50 мкг/мл) и *S. granarius* (ЛД₅₀ 23 мкг/мл) [144]. Обработка листьев розы *Rosa chinensis* нефитотоксичными дозами ТеК (0.06 мкг/мл) приводила к стимуляции выработки защитных метаболитов растения и к гибели тли *Macrosiphum rosivorum* на уровне 80% по сравнению с контролем [145].

Некоторые альтернарии способны образовывать ингибиторы различных холинэстераз и могут быть использованы в создании инсектицидных препаратов, многие из которых действуют на холиновые рецепторы насекомых [146]. Так, из культуры *A. alternata* был выделен альтенуен (рис. 4, 1), соединение, обладающее высокой ацетилхолинэстераза-ингибирующей активностью, который при добавлении в корм на уровне 50 мг/мл вызывал гибель более чем 70% гусениц *Spodoptera litura* [147]. Деструксин В продемонстрировал более высокую цитотоксическую активность по отношению к клеточной линии Sf9 из *Spodoptera frugiperda* по сравнению с другими деструксинами и их синтетическими производными [148].

Из культуры эндофита виноградной лозы, идентифицированного как *A. alternata*, были выделены три соединения из группы дикетопиперазинов (рис. 4, 2–4). Соединения ингибировали спороношение возбудителя ложной мучнистой росы винограда *Plasmopara viticola* и не оказывали фитотоксическое действие на его листья [149]. Продуцирующий эти дикетопиперазины штамм *A. alternata* и его метаболиты были запатентованы как основа для фунгицидного препарата [150]. Радицинин (рис. 4.5), известный у *A. radicina* [151], *A. helianthi* [152], *A. chrysanthemi* [153] и *Cochliobolus australiensis* [154], обладает заметной ингибирующей активностью (в концентрации 50 мкг/диск) по отношению к бактерии *Xylella fastidiosa*, крайне опасного карантинного патогена виноградной лозы в Европе. Предполагают, что этот метаболит подавляет протеазу этой фитопатогенной бактерии [155].

Большинство изученных *Alternaria* spp. способны к образованию фитотоксинов. Некоторые из них обладают гербицидным потенциалом: высокой фитотоксической активностью, определенной селективностью и новыми механизмами действия на растения. В настоящее время ощущается острая нехватка гербицидов с такими свойствами [11, 156, 157]. В разное время среди фитотоксинов грибов рода *Alternaria* в качестве прообразов химических гербицидов рассматривались AAL-токсин, ТТ, макулозин, ТеК и многие другие.

AAL-токсин был выделен и охарактеризован в конце 1970-х гг. как ХСТ специализированной формы *A. alternata*, вызывающей рак стеблей томатов [77]. Информации о встречаемости этого токсина до сих пор мало, поскольку в чистой культуре он образуется более чем через 1 мес культиви-

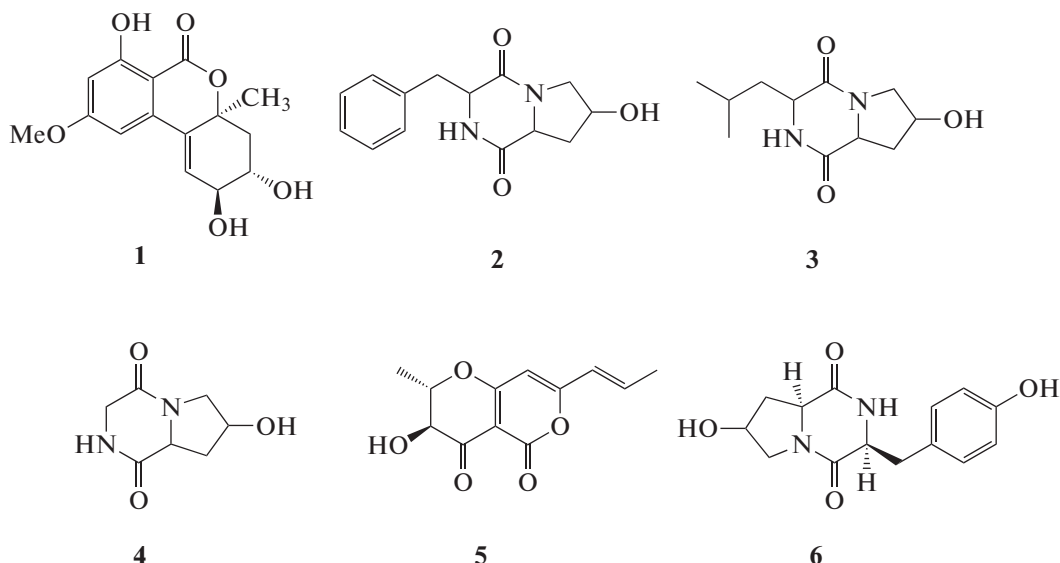


Рис. 4. Вторичные метаболиты грибов рода *Alternaria* как прообразы действующих веществ химических пестицидов: **1** – альтенуен, **2** – цикло (L-фенилаланин-транс-4-гидрокси-L-пролин), **3** – цикло (L-лейцин-транс-4-гидрокси-L-пролин), **4** – цикло (L-аланин-транс-4-гидрокси-L-пролин), **5** – радицинин, **6** – макулозин.

рования при 30°C [158]. AAL-токсин (рис. 2, б) рассматривался как перспективная основа для разработки гербицида против ряда сорных растений, таких как щирица запрокинутая, дурман обыкновенный, эшиномене виргинская, сесбания возвышенная и др. [159, 160]. Механизм фитотоксического действия этого соединения заключается в ингибировании церамидсинтазы. Однако AAL-токсин проявляет токсичность по отношению к млекопитающим, что ограничивает его перспективность в качестве химического гербицида [161]. Попытки получить синтетические аналоги этого ФТ, обладающие высокой фитотоксической активностью и в то же время низкой токсичностью для млекопитающих, не увенчались успехом [162]. Структура AAL-токсина имеет высокую степень сходства с фумонизинами – канцерогенными микотоксинами некоторых грибов рода *Fusarium* [163]. Фумонизины проявляли более слабую биологическую активность на листьях томата, чем AAL-токсин. Однако совместная обработка восприимчивого сорта томата конидиями непатогенного штамма *A. alternata* и фумонизином приводила к такому же образованию некротических пятен, как и в результате инокуляции конидиями патогенного штамма *A. alternata* f. sp. *lycopersici* [160].

Циклический тетрапептид тентоксин (ТТ) (рис. 1, 3) образуют многие виды рода *Alternaria*: (например, *A. alternata*, *A. linicola* и *A. porri*), а также некоторые представители других родов грибов [16]. Его роль в патогенности альтернаний еще не доказана, однако, ТТ⁻мутанты *Cochliobolus miyabeanus* были менее патогенны на листьях риса,

чем штамм дикого типа. Отмечена положительная связь между образованием ТТ у различных изолятов гриба и его патогенностью [164]. ТТ проявляет широкий спектр фитотоксической активности в микромолярных концентрациях и обладает качествами, необходимыми для потенциально нового химического гербицида [11]. Фитотоксическое действие ТТ проявляется в виде хлорозов. Его механизм действия специфичен для растений. ТТ является ингибитором АТФазы хлоропластов [165]. Некоторые его синтетические производные связывались с этим ферментом менее эффективно чем ТТ [166]. Сложность разработки нового гербицида на основе ТТ заключается, как в низком выходе из культуры гриба-продуцента *A. alternata* (макс. 90 мг/л), так и многостадийном химическом синтезе [165–167]. Эта задача сможет быть решена в будущем при помощи оптимизации состава питательной среды и условий культивирования продуцентов ТТ, либо при помощи подходов метаболической инженерии. Так, идентифицированы два гена, кодирующих предполагаемую нерибосомальную пептидсинтазу *TES* и цитохром 450-белок *TES1*, которые необходимы для биосинтеза ТТ у *A. alternata* ZJ33 [168]. Подана заявка на получение патента, где идентифицирован ген, отвечающий за синтез ТТ и его прекурсора, а также приведена методика получения ТТ гетерологичной экспрессией [169].

Из культуры гриба *A. alternata*, поражающего василек пятнистый (*Centaurea maculosa*), который является проблемным инвазивным растением в Северной Америке, был выделен селективный фитотоксин макулозин (рис. 4, б). Структура ма-

кулозина представляет собой дикетопиперазин цикло-(L-Pro-L-Tyr). При оценке активности макулозина по отношению к 19 видам растений его фитотоксическое действие было обнаружено только по отношению к растению-хозяину. Так, наиболее чувствительными к макулозину оказались растения василька, собранные в том же районе, в котором были собраны пораженные образцы. На листовых дисках этих растений макулозин был токсичен при микромолярной концентрации. Растения, собранные в отдаленных районах, оказались менее чувствительными к нему. Можно предположить, что макулозин является специфичным по отношению к определенным генотипам *C. maculosa* [170]. При этом он оказался неэффективен при обработке целых растений василька. Минорный метаболит *A. alternata*, цикло(L-Pro-L-Phe), проявлял активность, как на надколотых листовых дисках, так и на целых растениях [171], и может быть использован как гербицид [172].

Упомянутый выше радицинин оценивается в качестве гербицидного соединения для борьбы с буфельской травой (*Cenchrus ciliaris*) — инвазивным сорным растением в Северной Америке. Он проявлял активность при концентрации 1 мМ, однако испытанные нативные растения были менее чувствительными к этому ФТ. У радицинина не обнаружены токсигенные свойства. Так, при концентрации 40 мкМ он не действовал на развитие эмбриона рыбы *Brachydanio rerio* [154]. Синтетический ($\pm$)-3-деоксирадицинин проявил схожий с природным ФТ уровень фитотоксической активности [173]. Радицинин и его производные можно получать биотехнологическими методами. Так, его выход в твердофазной культуре некоторых изолятов *A. radicina* на субстрате из рисовой крупы превышал 3 г/кг субстрата [174].

Среди фитотоксинов грибов рода *Alternaria* наиболее активно в настоящее время изучается гербицидная активность ТеК. Тенуазоновая и изо-тенуазоновая кислоты были запатентованы в качестве природных неселективных гербицидов [175]. В чувствительных растениях ТеК ингибирует транспорт электронов в фотосистеме II путем связывания с D1-белком, который является молекулярной мишенью многих коммерческих гербицидов. Однако механизм связывания ТеК с мишенью оригинален. По классификации токсичности пестицидов ТеК относится к среднетоксичным и может использоваться в качестве послевсходового гербицида [176]. Период полураспада ТеК в почве составляет около 3 сут, а его остаточные количества обнаруживаются в течение 20 сут [177]. В полевых испытаниях синтетическая ТеК уничтожала свыше 90% молодых растений агератны железистой (*Ageratina adenophora*) при норме расхода 600 г/га. В посевах хлопка ТеК с добавлением в качестве адъюванта полиоксиэтиленовых эфиров жирных спиртов и лаурокапрама успешно уни-

чтожал два вида экономически значимых сорных растений *Digitaria sanguinalis* и *Amaranthus retroflexus* при норме расхода 1125 г/га [178].

Прообразы лекарственных средств. Вторичные метаболиты микроорганизмов представляют собой источник базовых структур для разработки новых лекарственных препаратов, в том числе и для лечения трудноизлечимых заболеваний человека [179, 180]. Многие метаболиты грибов рода *Alternaria* проявили биологическую активность, перспективную с точки зрения медицинской химии — цитотоксическую (альтерпорриолы и депудецин), антибактериальную (альтенузин и брасициколин), противопаразитарную (депудецин и альтенузин), противовирусную и др. Некоторые из них будут рассмотрены ниже.

Производные антрахинона, образуемые видами *A. porri* и *A. solani*, проявляют цитотоксическую активность по отношению к различным клеточным линиям. Альтерпорриол F (рис. 5, 1), выделенный из *A. porri*, обладал цитотоксической активностью по отношению к клеткам карциномы шейки матки (линия HeLa) и плоскоклеточного рака кожи (линия KB), величина концентрации полумаксимального ингибирования (ИК₅₀) составила 6.5 и 7.0 мкг/мл соответственно [17]. Альтерпорриол L (рис. 5, 2), выделенный из *Alternaria* sp. ZJ9-6B, показал перспективную цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака молочной железы на уровне ИК₅₀ 20 мкМ. Он ингибировал рост и пролиферацию опухолевых клеток, а также вызывал их некроз и апоптоз [181]. Известно, что альтерсоланол А в микромолярных концентрациях обладает цитотоксической активностью по отношению к клеткам миелогенной лейкемии (линия K562) и карциномы легкого (линия A549). Альтерсоланол А при концентрации 25 мкМ индуцировал апоптоз в раковых клетках, и при этом в меньшей степени затрагивалась жизнеспособность клеток без раковых изменений (моноклеарные клетки периферической крови) [182].

Деструксины и, в частности, деструксин В (ДБ) (рис. 3, 5) интересны как цитотоксические и противоопухолевые соединения, и их биотехнологический потенциал активно изучается [183]. Так, ДБ ингибирует рост различных линий опухолевых клеток человека (Sk-Hep1, Hep G2, Mahlavu, Huh7, HepJ5, HT29, HCT116 и SW480) с ИК₅₀ от 2 до 6 мкМ. В предклинических испытаниях ДБ ингибировал опухолеобразование у HT29-ксено-трансплантатных мышей. В образцах опухолевой ткани было отмечено ингибирование β -катенина, циклина D1, сурвивина и эндотелиального маркера CD31 и, наоборот, повышенная экспрессия каспазы-3. В целом, это демонстрирует, что ДБ является ингибитором Wnt/ β -катенин/Tcf-сигнального пути, и в сочетании с другими химиотерапевтиче-

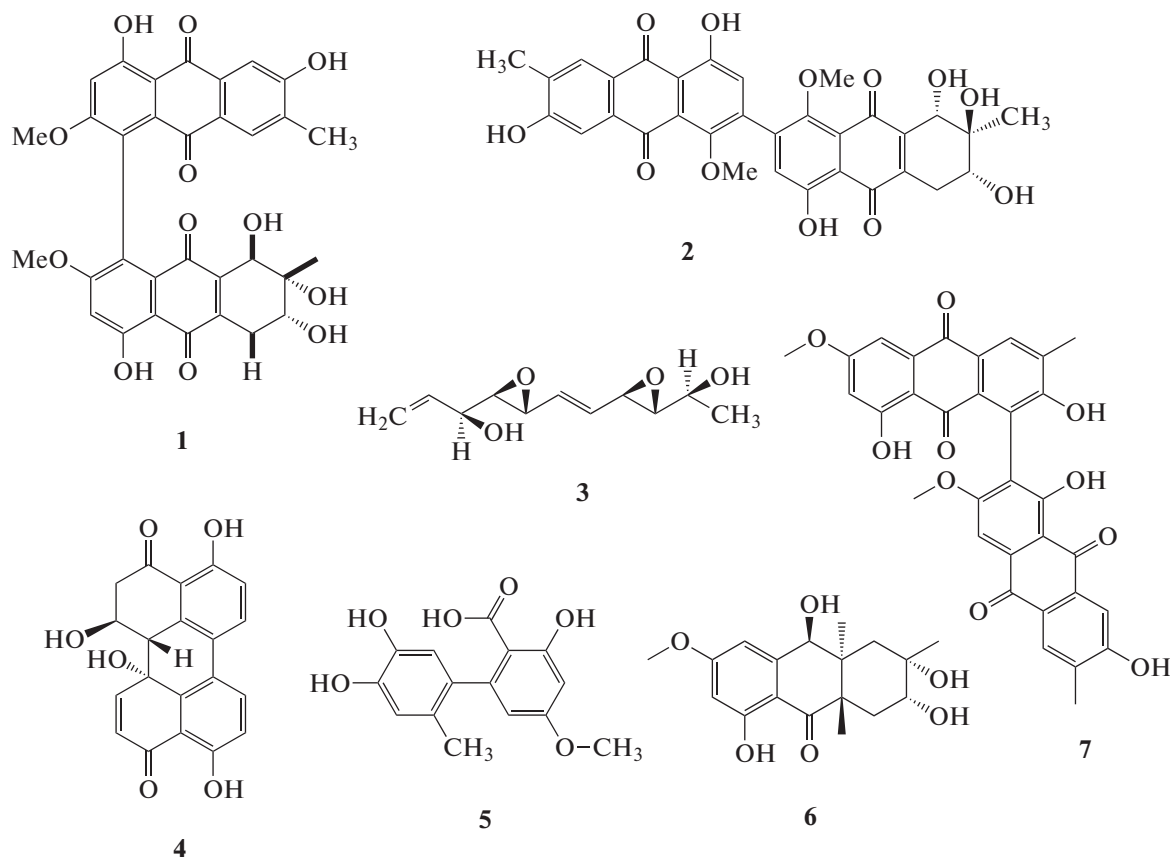


Рис. 5. Биологически активные вещества грибов рода *Alternaria* как прообразы лекарственных средств для медицины и ветеринарии: 1 – альтерпорриол F, 2 – альтерпорриол L, 3 – депудецин, 4 – альтейхин, 5 – альтенузин, 6 – тетрагидроальтерсоланол С, 7 – альтерпорриол Q.

скими средствами может быть полезен для лечения колоректального рака [184, 185]. ДБ вызывает апоптоз клеток лимфомы человека (линия Toledo) с IC_{50} 1.9 мкМ, что включает изменения мембранного потенциала [186]. На вариантах линии клеток карциномы кишечника (линия НСТ116), устойчивых к действию деструксинов, был изучен молекулярный механизм резистентности. В устойчивых клетках наблюдались изменения в биохимических свойствах мембран и повышение содержания холестерина, что, по-видимому, приводило к снижению их проницаемости для деструксинов [187].

Метаболит *A. brassicicola*, депудецин (рис. 5, 3), способен в микромолярных концентрациях индуцировать дифференцировку опухолевых клеток. Предполагаемый механизм действия депудецина заключается в ингибировании деацетилаз гистоновых белков (HDAC). Значение IC_{50} для депудецина в опытах по ингибированию HDAC *in vitro* (4.7 мкМ) сравнимы с IC_{50} в биотесте на обратную трансформацию опухолевых клеток (4.7–47 мкМ) [188].

Альтейхин из *A. eichorniae* (рис. 5, 4) ингибирует со значением IC_{50} 30 мкМ активность теломе-

разы, которая является перспективной мишенью для терапии онкологических заболеваний, не действуя при этом на вирусную обратную транскриптазу [189]. Альтертотоксин VII проявил цитотоксическую активность по отношению к клеткам миелогенной лейкемии (линия K562), аденокарциномы шейки матки (линия SGC-7901) и карциномы печени человека (линия BEL-7402) со значениями IC_{50} 26.6, 8.8 и 13.1 мкг/мл соответственно [190].

Ряд соединений, описанных у *Alternaria* spp., проявляют антимикробную активность. Так, производное дифенила альтенузин (рис. 5, 5), обнаруженный у нескольких видов *Alternaria*, подавляет рост клинических штаммов *Paracoccidioides brasiliensis*, вызывающих системные микозы человека. Минимальные действующие концентрации альтенузина для различных штаммов *P. brasiliensis* составили 2 – 31 мкМ [191]. Брассициколин А (рис. 3, 6) из *A. brassicicola* проявляет антимикробную активность против *S. aureus* и *B. subtilis* со значениями минимальной ингибирующей концентрации 1.5 и 8.0 мкг/мл соответственно [100]. Из твердофазной культуры *A. sonchi* был выделен антибиотик хлоромонилицин, ак-

тивный в концентрации 0.5 мкг/диск по отношению к *E. coli*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* и *Candida tropicalis*. Хлоромоницин в концентрации 10 мкг/мл подавлял также прорастание конидий фитопатогенных грибов *F. culmorum*, *Bipolaris sorokiniana* и *C. gloeosporioides* [192].

Депудецин и альтенузин могут быть использованы для борьбы с паразитарными заболеваниями животных и человека. В концентрации 0.5 мкг/мл депудецин значительно снижал внутриклеточное размножение возбудителя неоспороза кокцидии *Neospora caninum*, но не проявлял цитотоксичности в отношении клеток-хозяев [193]. Альтенузин являлся ингибитором трипанотион-редуктазы *in vitro*, значение ИК₅₀ составило 4.3 мкМ. Альтенузин был предложен для борьбы с такими паразитарными заболеваниями, как трипаносомоз и лейшманиоз [194].

Известны противовирусные метаболиты *Alternaria* spp. Альтертоксин V в концентрации 0.5 мкМ подавлял репликацию ВИЧ [195]. Тетрагидроальтерсоланол C и альтерпорриол Q (рис. 5, 6 и 7, соответственно) из *Alternaria* sp. ZJ-2008003 проявили противовирусную активность по отношению к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней [196].

Альтенузин представляет интерес как ингибитор агрегации тау-белка, одного из ключевых этапов развития болезни Альцгеймера. В опытах *in vitro* на клетках нейробластомы человека (линия SH-SY5Y) альтенузин в концентрациях 5–10 мкМ индуцировал образование олигомерных и глобулярных структур тау-белка, в то время как особую опасность при развитии болезни Альцгеймера представляют фибриллярные структуры [197]. В КНР альтенузин был запатентован в качестве компонента лекарственных средств, воздействующих на фарнезоидный X-рецептор (FXR), играющий значительную роль в развитии цирроза печени, ожирения, диабета 2-го типа и дислипидемии [198, 199].

Для наработки наиболее перспективных БАВ альтернаний, в частности депудецина и альтенузина, в качестве альтернативы биотехнологическому методу получения предложены эффективные схемы химического синтеза [200, 201]. Таким образом, грибы рода *Alternaria* могут служить как источником новых БАВ с перспективной фармакологической активностью, так и выступать в качестве продуцентов уже хорошо известных биологически активных соединений.

Метаболиты грибов рода *Alternaria* в качестве хемотаксономических маркеров. Хемотаксономика широко используется для характеристики и дифференциации различных таксонов грибов, в частности, токсигенных видов *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium* [202]. Важно отметить, что в отличие от молекулярно-генетических методов, основанных

на анализе последовательностей генов ITS, TEF и GPD, анализ метаболома *Alternaria* spp. в определенной степени отражает их функции и, соответственно, потенциальную токсигенность [203]. В настоящее время для хемотаксономических исследований грибов рода *Alternaria* используется стандартный и простой протокол культивирования грибов и экстракции их метаболитов. Из нескольких двухнедельных колоний, полученных на стандартной агаризованной среде (например, DRYES), вырезают несколько блоков, из которых грибные метаболиты экстрагируют при помощи ультразвука подкисленным этилацетатом. После удаления растворителя сухой остаток перерастворяют в метаноле, и его состав анализируют различными методами хроматографии. При таком подходе за несколько суток можно проанализировать десятки образцов [204–206]. Для более полного определения биосинтетического потенциала грибов их культивируют на различных жидких и твердых питательных субстратах [10]. Тем не менее, использовать хемотаксономический подход нужно с осторожностью в рамках полифазного подхода, учитывая, что состав питательных субстратов, длительность и условия культивирования могут оказать существенное влияние на образование анализируемых метаболитов грибов [202].

Составы ВЭЖХ-УФ профилей экстрактов *A. infectoria* существенно отличаются от других представителей рода *Alternaria* наличием уникальных метаболитов [207]. Так, хроматографический и спектральный анализ при использовании ВЭЖХ/МС-МС и ВЭЖХ/МСВР состава метаболитов в экстрактах из 14 сут твердофазных культур (на рисовой крупе) мелкоспоровых *Alternaria* spp., собранных в Германии и России, позволил четко разделить представителей секций *tenuissima* и *infectoria*. Однако внутри секции *tenuissima* существенные различия по количественному и качественному составу метаболитов (проанализировано наличие 15 микотоксинов) среди видов *A. alternata*, *A. tenuissima* и *A. arborescens* не были обнаружены [208]. Аналогичные результаты получены при анализе экстрактов аргентинских изолятов мелкоспоровых альтернаний, выделенных из различных сельскохозяйственных культур и выращенных на агаризованной среде DRYES в течение 2 нед. [206].

Для *A. infectoria* предложено несколько хемотаксономических маркеров (например, инфектопирон) (рис. 6, 1) [209]. Из 153 изученных штаммов представителей рода *Alternaria* у 33 был обнаружен инфектопирон и все они относились комплексу '*A. infectoria*'. Инфектопирон был также обнаружен у видов *Stemphylium sarciniforme*, *S. vesicarium* и *Ulocladium consortiale* [210]. У других видов комплекса '*A. infectoria*' (*A. ethzedia*, *A. graminicola*, *A. infectoria*, *A. metachromatica* и др.) метаболиты изучены недостаточно. Столь существенная

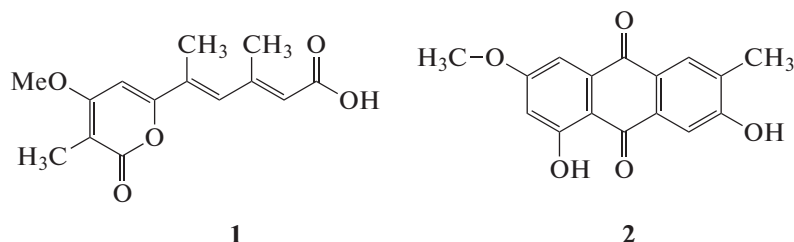


Рис. 6. Хемотаксономические маркеры различных видов *Alternaria* **1** — инфектопирон (комплекс видов *A. infectoria*), **2** — макроспорин (секция *Porri*).

филогенетическая и метаболомная дифференциация грибов группы *infectoria* от других мелкоспоровых грибов рода *Alternaria* может быть основанием для вывода их в отдельный род [211].

При помощи ВЭЖХ/УФ и факторного анализа изучен набор вторичных метаболитов некоторых крупноспоровых видов альтернарий (*A. dauci*, *A. porri*, *A. solani* и *A. tomatophila*), который показал, что у изучаемых микромицетов присутствует ряд общих метаболитов: антрахиноновые пигменты — макроспорин (рис. 6, 2) и альтерсоланол А (рис. 3, 2), а также альтернариол. Альтертоксин I был характерен, как для *A. solani*, так и *A. tomatophila*, а у *A. dauci* и *A. porri* он не был выявлен. В составе экстрактов обнаружены также и неизвестные метаболиты, специфичные для *A. dauci*, *A. solani* и *A. tomatophila*. Кластерный анализ позволил дифференцировать эти три вида, в то время как различные изоляты *A. porri* не удалось сгруппировать [212]. Сравнением протеома упомянутых крупноспоровых видов методом MALDI-TOF не были разделены виды *A. solani* и *A. tomatophila*, однако различными молекулярно-генетическими методами они отлично дифференцируются [213, 214].

Таким образом, грибы рода *Alternaria* способны синтезировать широкий набор биологически активных веществ, относящихся ко всем группам природных соединений, которые могут быть использованы как прообразы лекарственных средств и пестицидов. Известно более 350 видов грибов этого рода, однако вторичные метаболиты изучены лишь у небольшого числа видов, главным образом, экономически значимых патогенов сельскохозяйственных культур и токсигенных видов. Очевидно, что потенциал грибов этого рода в качестве продуцентов биологически активных соединений остается очень высоким. Дальнейший прогресс в изучении биологически активных соединений грибов рода *Alternaria* будет связан с углубленной токсикологической оценкой уже известных и новых метаболитов, определением роли фитотоксинов этих грибов в патогенезе заболеваний растений и изучением биосинтеза и механизмов действия наиболее перспективных из

них. Разработки методов количественного определения токсинов альтернариодных микромицетов в различных матрицах могут быть полезны для оценки безопасности как биогербицидов на основе *Alternaria* spp., так и их метаболитов, предложенных для борьбы с сорными растениями. Сравнительный анализ профилей вторичных метаболитов может быть использован как дополнительный инструмент для дифференциации видов альтернариодных грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 16-16-00085).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawrence D., Rotondo F., Gannibal P. // Mycol. Prog. 2016. V. 15. № 3. P. 1–22.
2. Woudenberg J.H.C., Seidl M.F., Groenewald J.Z., de Vries M., Stielow J.B., Thomma B.P.H.J., Crous P.W. // Stud. Mycol. 2015. V. 82. P. 1–21.
3. Gannibal Ph.B. // Mycotaxon. 2018. V. 133. № 1. P. 37–43.
4. Thomma H. J. // Mol. Plant Pathol. 2003. V. 4. № 2. P. 225–236.
5. Bannon J.S. // Am. J. Alternative Agr. 1988. V. 3. № 2–3. P. 73–76.
6. Shabana Y.M., Charudattan R., Elwakil M.A. // Biol. Control. 1995. V. 5. № 2. P. 136–144.
7. Green S., Bailey K.L. // Biol. Control. 2000. V. 19. № 2. P. 167–174.
8. Kaur J., Aggarwal N.K. // Crop Prot. 2015. V. 4. P. 719–726.
9. Lou J., Peng Y., Fu L., Zhou L. // Molecules. 2013. V. 18. № 5. P. 5891–5935.
10. Берестецкий А.О., Далинова А.А., Волосатова Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 3. С. 271–281.
11. Duke S.O., Owens D.K., Dayan F.E. Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide / Eds. N.E. Korres, N.R. Burgos, S.O. Duke. Boca Raton: CRC Press, 2019. 663 p.
12. Streit E., Schwab C., Sulyok M., Naehrer K., Krska R., Schatzmayr G. // Toxins. 2013. V. 5. № 3. P. 504–523.

13. Pero R.W., Posner H., Blois M., Harvan D., Spalding J.W. // Environ. Health Perspect. 1973. V. 4. P. 87–94.
14. Ostry V. // World Mycotoxin J. 2008. V. 1. № 2. P. 175–188.
15. Meronuck R.A., Steele J.A., Mirocha C.J., Christensen C.M. // Appl. Microbiol. 1972. V. 23. № 3. P. 613–617.
16. Pinto V.E.F., Patriarca A. Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols / Eds. A. Moretti, A. Susca. NY: Springer Science+Business Media LLC, 2017. 379 p.
17. Phuwapraisirisan P., Rangsan J., Siripong P., Tipyang S. // Nat. Prod. Res. 2009. V. 23. № 12. P. 1063–1071.
18. Vaquera S., Patriarca A., Pinto V.F. // Int. J. Food Microbiol. 2016. V. 219. P. 44–49.
19. Tian J., Fu L., Zhang Z., Dong X., Xu D., Mao Z. et al. // Nat. Prod. Res. 2016. V. 31. № 4. P. 387–396.
20. Griffin G.F., Chu F.S. // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 46. № 6. P. 1420–1422.
21. Bottalico A., Logrieco A. Mycotoxins in Agriculture and Food Safety / Eds. K.K. Sinha, D. Bhatnagar. NY: Marcel Dekker Inc., 1998. P. 65–108.
22. Brugger E.-M., Wagner J., Schumacher D.M., Koch K., Podlech J., Metzler M., Lehmann L. // Toxicol. Lett. 2006. V. 164. № 3. P. 221–230.
23. Solhaug A., Eriksen G. S., Holme J. A. // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2016. V. 119. № 6. P. 533–539.
24. Liu G.T., Qian Y.Z., Zhang P., Dong W.H., Qi Y.M., Guo H.T. // Chin. Med. J. 1992. V. 105. № 5. P. 394–400.
25. Bensassi F., Gallerne C., Sharaf El Dein O. // Toxicol In Vitro. 2012. V. 26. № 6. P. 915–923.
26. Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Christensen M.O., Boege F., Altemoller M., Podlech J., Marko D. // Mol. Nutr. Food Res. 2009. V. 53. № 4. P. 441–451.
27. Fernández-Blanco C., Juan-García A., Juan C., Font G., Ruiz M.-J. // Food Chem. Toxicol. 2016. V. 88. P. 32–39.
28. Grover S., Lawrence C.B. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 7. P. 1577.
<https://doi.org/10.3390/ijms18071577>
29. Tiemann U., Tomek W., Schneider F., Müller M., Pöhl-land R., Vanselow J. // Toxicol. Lett. 2009. V. 86. P. 139–145.
30. Dellafiora L., Warth B., Schmidt V., Del Favero G., Mikula H., Fröhlich J., Marko D. // Food Chem. 2018. V. 248. P. 253–261.
31. Stack M.E., Prival M.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V. 52. № 4. P. 718–722.
32. Fleck S.C., Burkhardt B., Pfeiffer E., Metzler M. // Toxicol. Lett. 2012. V. 214. № 1. P. 27–32.
33. Schwarz C., Tiessen C., Kreutzer M., Stark T., Hofmann T., Marko D. // Arch. Toxicol. 2012. V. 86. № 12. P. 1911–1925.
34. Del Favero G., Zaharescu R., Marko D. // Arch. Toxicol. 2018. V. 92. № 12. P. 3535–3547.
35. Boutin B., Peeler J., Twedt R. // J. Toxicol. Environ. Health. Part A. 1989. V. 26. № 1. P. 75–81.
36. Седова И.Б., Киселева М.Г., Чалый З.А., Аксенов И.В., Захарова Л.П. // Усп. Мед. Микол. 2018. Т. 19. С. 329–330.
37. Gotthardt M., Asam S., Gunkel K., Moghaddam A.F., Baumann E., Kietz R., Rychlik M. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 109.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00109>
38. European Food Safety Authority (EFSA) // EFSA J. 2016. V. 14. № 12. P.e04643.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4643>
39. Asam S., Habler K., Rychlik M. // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 12. P. 4149–4158.
40. Fliszár-Nyúl E., Lemli B., Kunsági-Máté S., Dellafiora L., Dall'Asta C., Cruciani G., Poór M. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 9. P. 2352.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092352>
41. Schuchardt S., Ziemann C., Hansen T. // EFSA supporting publication. 2014. V. 11. № 11. P. 679E.
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-679>
42. Zwickel T., Kahl S., Klaffke H., Rychlik M., Müller M. // Toxins. 2016. V. 8. № 11. P. 344.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201300879>
43. Vajdovszky K., Schmidt V., Warth B., Marko D. // Mol. Nutr. Food Res. 2016. V. 61. № 3. P. 1600526.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600526>
44. Vajdovszky K., Sack M., Jarolim K., Aichinger G., Somoza M. M., Marko D. // Toxicol. Lett. 2017. V. 267. P. 45–52.
45. Escrivá L., Oueslati S., Font G., Manyes L. // J. Food Qual. 2017. P. 1–20.
<https://doi.org/10.1155/2017/1569748>
46. Puntischer H., Kütt M.-L., Skrinjar P., Mikula H., Podlech J., Fröhlich J., Warth B. // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. № 18. P. 4481–4494.
47. Myresiotis C.K., Testempasis S., Vryzas Z., Karaoglani- idis G.S., Papadopoulou-Mourkidou E. // Food Chem. 2015. V. 182. P. 81–88.
48. Амелин В.Г., Карасева Н.М., Третьяков А.В. // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 3. С. 212–223.
49. Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., Saeger S. D., Haesaert G., Karlovsky P., Siroka J. // Mol. Nutr. Food Res. 2012. V. 57. № 1. P. 165–186.
50. Puntischer H., Cobankovic I., Marko D., Warth B. // Food Control. 2019. V. 102. P. 157–165.
51. Puntischer H., Hanke S., Tillmann K., Attakpah E., Braun D., Kütt M.L., Del Favero G., Aichinger G., Pahlke G., Höger H., Marko D., Warth B. // Toxicol. Lett. 2019. V. 301. P. 168–178.
52. Lee H.B., Patriarca A., Magan N. // Mycobiology. 2015. V. 43. № 2. P. 93–106.
53. Noser J., Schneider P., Rother M., Schmutz H. // Mycotoxin Res. 2011. V. 27. № 4. P. 265–271.
54. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 79–83.
55. Джатдоева А.А., Селимов Р.Н., Грачева Т.С., Метальников П.С., Комаров А.А. // Усп. Мед. Микол. 2018. Т. 19. С. 297–298.
56. Селимов Р.Н., Джатдоева А.А., Метальников П.С., Комаров А.А. // Ветеринария. 2017. № 12. С. 53–57.
57. Prendes L.P., Fontana A.R., Merin M.G., D' Amario Fernández A., Bottini R., Ramirez M.L., Morata de Am-

- broisini V.I. // Food Sci. Nutr. 2018. V. 6. № 3. P. 523–531.
58. Walravens J., Mikula H., Rychlik M., Asam S., Devos T., Njumbe Ediage E., De Saeger S. // J. Agr. Food Chem. 2016. V. 64. № 24. P. 5101–5109.
 59. Ramires F., Masiello M., Somma S., Villani A., Susca A., Logrieco A., Moretti A. // Toxins. 2018. V. 10. № 11. P. 472.
<https://doi.org/10.3390/toxins10110472>
 60. Puntischer H., Marko D., Warth B. // Front. Nutrit. 2019. V. 6. P. 92.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00092>
 61. Tan X., Zhang X., Yu M., Yu Y., Guo Z., Gong T., Ding G. // Phytochemistry. 2019. V. 164. P. 154–161.
 62. Brase S., Glaser F., Kramer C.S., Linder S., Linsenmeier A.M., Masters K.S., Meister A.C., Ruff B.M., Zhong S. // Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 2013. V. 97. P. 1–300.
 63. Möbius N., Hertweck C. // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. № 4. P. 390–398.
 64. Mitchell R.E. // Annu. Rev. Phytopathol. 1984. V. 22. P. 215–245.
 65. Берестецкий А.О., Чистый Л.С., Мироненко Н.В. // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 3. С. 196–207.
 66. Akimitsu K., Tsuge T., Kodama M., Yamamoto M., Otani H. // J. Gen. Plant. Pathol. 2014. V. 80. № 2. P. 109–122.
 67. Tsuge T., Harimoto Y., Akimitsu K., Ohtani K., Kodama M., Akagi Y., Egusa M., Yamamoto M., Otani H. // FEMS Microbiol. Rev. 2013. V. 37. № 1. P. 44–66.
 68. Park P., Nishimura S., Kohmoto K., Otani H., Tsujimoto K. // Can. J. Bot. 1981. V. 59. № 3. P. 301–310.
 69. Yamagishi D., Akamatsu H., Otani H., Kodama M. // J. Gen. Plant. Pathol. 2006. V. 72. № 5. P. 323–327.
 70. Friesen T. L., Faris J. D., Solomon P. S., Oliver R. P. // Cell. Microbiol. 2008. V. 10. № 7. P. 1421–1428.
 71. Ueno T., Nakashima T., Hayashi Y., Fukami H. // Agr. Biol. Chem. 1975. V. 39. № 5. P. 1115–1122.
 72. Nakashima T., Ueno T., Fukami H., Taga T., Masuda H., Osaki K., Otani H., Kohmoto K., Nishimura S. // Agr. Biol. Chem. 1985. V. 49. № 3. P. 807–815.
 73. Nakatsuka S., Ueda K., Goto T., Yamamoto M., Nishimura S., Kohmoto K. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 24. P. 2753–2756.
 74. Itoh Y., Kohmoto K., Shimomura N., Otani H., Kodama M., Nakatsuka S. A. // Ann. Phytopath. Soc. Japan. 1993. V. 59. № 4. P. 416–427.
 75. Gardner J.M., Konoa Y., Tatumb J.H., Suzukia Y., Takeuchia S. // Phytochemistry. 1985. V. 24. № 12. P. 2861–2867.
 76. Clouse S.D., Martensen A. N., Gilchrist D. G. // J. Chromatog. 1985. V. 350. P. 255–263.
 77. Ohtani K., Yamamoto H., Akimitsu K. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. V. 99. № 4. P. 2439–2444.
 78. Ганнибал Ф.Б., Бильдер И.В., Ули-Маттила Т. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 1. С. 18–25.
 79. Prieto K.R., Medeiros L.S. de, Isidoro M.M., Toffano L., Silva M.F.G.F. da, Fernandes J.B., Machado M.A. // J. Braz. Chem. Soc. 2016. V. 27. № 8. P. 1493–1505.
 80. Garganese F., Schena L., Siciliano I., Prigigallo M.I., Spadaro D., De Grassi A., Sanzani S.M. // PLOS ONE. 2016. V. 11. № 9. e0163255.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163255>
 81. Meena M., Samal S. // Toxicol. Rep. 2019. V. 6. P. 745–758.
 82. Brian P.W., Curtis P.J., Hemming H.G., Unwin C.H., Wright G.M. // Nature. 1949. V. 164. № 4169. P. 534.
<https://doi.org/10.1038/164534a0>
 83. Langsdorf G., Furuchi N., Doke N., Nishimura S. // J. Phytopathol. 1990. V. 128. № 4. P. 271–282.
 84. Brian P.W., Elson G.W., Hemming H.G., Wright J.M. // Ann. Appl. Biol. 1952. V. 39. № 3. P. 308–321.
 85. Furuichi N., Nishimura S., Langsdorf G. // Ann. Phytopath. Soc. Japan. 1992. V. 58. P. 1–7.
 86. Bessadat N., Berruyer R., Hamon B., Bataille-Simoneau N., Benichou S., Kihal M., Simoneau P. // Eur. J. Plant Pathol. 2016. V. 148. № 1. P. 181–197.
 87. Stoessl A. // Chem. Comm. 1967. № 7. P. 307–308.
 88. Haraguchi H., Abo T., Fukuda A., Okamura N., Yagi A. // Phytochemistry. 1996. V. 43. № 5. P. 989–992.
 89. Ichihara A., Tazaki H., Sakamura S. // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. № 48. P. 5373–5376.
 90. Hohl B., Weidemann C., Hohl U., Barz W. // J. Phytopathol. 1991. V. 132. № 3. P. 193–206.
 91. Kim W., Park C.-M., Park J.-J., Akamatsu H.O., Peever T.L., Xian M., Gang D.R., Vandemark G., Chen W. // MPMI. 2015. V. 28. № 4. P. 482–496.
 92. Liebermann B., Ellinger R., Ihn W. // J. Phytopathol. 1994. V. 140. P. 385–388.
 93. Liebermann B., Nussbaum R.-P., Gunther W. // Phytochemistry. 2000. V. 55. № 8. P. 987–992.
 94. Ayer W.A., Pena-Rodriguez L.M. // J. Nat. Prod. 1987. V. 50. № 3. P. 400–407.
 95. Parada R. Y., Oka K., Yamagishi D., Kodama M., Otani H. // Physiol. Mol. Plant P. 2007. V. 71. № 1–3. P. 48–54.
 96. Pedras M.S., Biesenthal C.J., Zaharia I.L. // Plant Sci. 2000. V. 156. № 2. P. 185–192.
 97. Ibrahim A.A., Asker M.S. // Aust. J. Basic Appl. Sci. 2012. V. 6. № 5. P. 284–288.
 98. Butt T.M., Hadj N.B.E., Skrobek A., Ravensberg W.J., Wang C., Lange C.M., Dudley E. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009. V. 23. № 10. P. 1426–1434.
 99. Pedras M.S., Khallaf I. // Phytochemistry. 2012. V. 77. P. 129–139.
 100. Gloer J.B., Poch G.K., Short D.M., McCloskey D. V. // J. Org. Chem. 1988. V. 53. № 16. P. 3758–3761.
 101. Pedras M.S.C., Chumala P.B., Jin W., Islam M.S., Hauck D.W. // Phytochemistry. 2009. V. 70. № 3. P. 394–402.
 102. Pedras M.S., Park M.R. // Mycologia. 2015. V. 107. № 6. P. 1138–1150.
 103. Meena M., Swapnil P., Upadhyay R.S. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 8777.
 104. Wenderoth M., Garganese F., Schmidt-Heydt M., Tobias S. S., Ippolito A., Sanzani S. M., Fischer R. // Mol. Microbiol. 2019. V. 112. № 1. P. 131–146.
 105. Yun C.-S., Motoyama T., Osada H. // Nat. Commun. 2015. V. 6. № 1. P. 8758.

106. Аврова А.О., Тютеев С.Л., Евстигнеева Т.А., Козырева О.Г. // Микология и фитопатология. 1993. Т. 27. № 6. С. 52–56.
107. Svavov S. // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2009. V. 23. № SE. P.881–884.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818563>
108. Tan K.-C., Phan H.T.T., Rybak K., John E., Chooi Y.H., Solomon P.S., Oliver R.P. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. № 501. P. 1–9.
109. Патент РФ. 1996. № 2066347.
110. Courtial J., Hamama L., Helesbeux J.-J., Lecomte M., Renaux Y., Guichard E., Voisine L., Yovanopoulos C., Hamon B., Ogé L., Richomme P., Briard M., Boureau T., Gagné S., Poupard P., Berruyer R. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 502.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00502>
111. Lal R., Lai S. Crop Improvement Utilizing Biotechnology / Eds. R. Lal, S. Lai. Boca Raton: CRC Press, 2018. 363 p.
112. Берестецкий А. О. // Вестник защиты растений. 2017. Т. 91. № 1. С. 5–12.
113. Watson A.K. Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide / Eds. N.E. Korres, N.R. Burgos, S.O. Duke. Boca Raton: CRC Press, 2019. 664 p.
114. Berestetskiy A, Sokornova S. Biological Approaches for Controlling Weeds / Ed. R. Radhakrishnan. London: IntechOpen, 2018. 463 p.
115. Andersen G.L., Lindow S.E. Biological control of *Carduus pycnocephalus* with *Alternaria* sp. // Proc. VI Int. Symp. Biol. Contr. Weeds. Vancouver, Canada: E. S. (ed.). Agric. Can. 1985. P. 593–600.
116. Lawrie J., Down V.M., Greaves M.P. // Biocontrol. Sci. Techn. 2000. V. 10. № 1. P. 81–87.
117. Singh J., Majumdar D., Pandey A., Pandey A.K. // Recent Res. Sci. Technol. 2010. V. 2. № 9. P. 22–27.
118. Motlagh M.R.S. // Afr. J. Microbiol. Res. 2012. V. 6. № 21. P. 4481–4488.
119. Aneja K.R., Kumar P., Sharma C. // J. Innov. Biol. 2014. V. 1. № 2. P. 117–121.
120. Mabbayad M.O., Watson A.K. // J. Crop Prot. 1995. V. 14. № 5. P. 429–433.
121. Green S., Bailey K. L., Tewari J. P. // Mycol. Res. 2001. V. 105. № 3. P. 344–351.
122. Ганнибал Ф.Б., Берестецкий А.О. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 2. С. 110–118.
123. Cook J.C., Charudattan R., Zimmerman T.W., Rosskopf E.N., Stall W.M., MacDonald G.E. // Weed Technol. 2009. V. 23. № 4. P. 550–555.
124. Vieira B.S., Barreto R.W. // Australas. Plant Pathol. 2010. V. 39. № 2. P. 154–160.
125. Walker H.L., Sciumbato G.L. // Weed Sci. 1979. V. 27. № 6. P. 612–614.
126. Патент РФ. 2019. № 2701957.
127. Патент США. 1984. № 4636386.
128. Патент США. 1986. № 4755207.
129. Патент США. 1988. № 4776873.
130. Патент США. 1990. № 4915726.
131. Robeson D., Strobel G., Matusumoto G.K., Fisher E.L., Chen M.H., Clardy J. // Experientia. 1984. V. 40. № 11. P. 1248–1250.
132. Патент КНР. 2008. № 101508959 A.
133. Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K., Pandey A.K., Prasad G.B.K.S., Bisen P.S. // J. Plant Prot. Res. 2010. V. 50. № 2. P. 133–139.
134. Берестецкий А.О., Юзихин О.С., Каткова А.С., Добродумов А.В., Сивогризов Д.Е., Коломбет Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 84–88.
135. Sassa T., Horiguchi K., Suzuki Y. // Agric. Biol. Chem. 1989. V. 53. № 5. P. 1337–1341.
136. Masi M., Meyer S., Clement S., Pescitelli G., Cimmino A., Cristofaro M., Evidente A. // J. Nat. Prod. 2017. V. 80. № 10. P. 2771–2777.
137. Varejão E.V.V., Demuner A.J., Barbosa L.C. de A., Barreto R.W. // Quim. Nova. 2013. V. 36. № 7. P. 1004–1007.
138. Haggblom P. // Microbiology. 1987. V. 133. № 12. P. 3527–3529.
139. Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrala A., Mędrala W. // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2014. V. 47. № 3. P. 354–365.
140. Hoagland R.E., Boyette C.D., Weaver M.A., Abbas H.K. // Toxin Rev. 2007. V. 26. № 4. P. 313–342.
141. Pickett J.A. // Resistance'91: Achievements and Developments in Combating Pesticide Resistance. Dordrecht: Springer, 1992. P. 354–365.
142. Shcherbakova L.A. Natural Products in Plant Pest Management / Ed. N.K. Dubey. Wallingford: CABI International, 2011. P. 109–133.
143. Lorschbach B.A., Sparks T.C., Cicchillo R.M., Garizi N.V., Hahn D.R., Meyer K.G. // Pest Manag. Sci. 2019. V. 75. P. 2301–2309.
144. La Croix E.A.S., Mhasalkar S.E., Mamalis P., Harrington F.P. // Pesticide Science. 1975. V. 6. № 5. P. 491–496.
145. Yang F., Yang B., Li B., Xiao C. // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2015. V. 16. № 4. P. 264–274.
146. Singh B., Bhagat J., Chadha B., Kaur A. // Biologia. 2014. V. 69. № 1. P. 10–14.
147. Bhagat J., Kaur A., Kaur R., Yadav A. K., Sharma V., Chadha B. S. // J. Appl. Microbiol. 2016. V. 121. № 4. P. 1015–1025.
148. Male K.B., Tzeng Y.-M., Montes J., Liu B.-L., Liao W.-C., Kamen A., Luong J. H. T. // Analyst. 2009. V. 134. № 7. P. 1447–1452.
149. Musetti R., Polizzotto R., Vecchione A., Borselli S., Zulini L., D'Ambrosio M., L. Sanita' di Toppi L., Pertot I. // Micron. 2007. V. 38. № 6. P. 643–650.
150. Патент США. 2009. № 20090257984 A1.
151. Solfrizzo M., Vitti C., De Girolamo A., Visconti A., Logrieco A., Fanizzi F.P. // J. Ag. Food Chem. 2004. V. 52. № 11. P. 3655–3660.
152. Tal B., Robeson J.D., Burke A.B., Aasen J.A. // Phytochemistry. 1985. V. 24. № 4. P. 729–731.
153. Robeson D.J., Gray G.R., Strobel G.A. // Phytochemistry. 1982. V. 21. № 9. P. 2359–2362.

154. Masi M., Meyer S., Clement S., Cimmino A., Evidente A. // Nat. Prod. Res. 2019. V. 5. P. 1–9.
155. Aldrich T.J., Rolshausen P.E., Roper M.C., Reader J.M., Steinhilber M.J., Rapicavoli J., Maloney K.N. // Phytochemistry. 2015. V. 116. P. 130–137.
156. Harding D.P., Raizada M.N. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 659.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00659>
157. Heap I. // Pest Manag. Sci. 2014. V. 70. № 9. P. 1306–1315.
158. Vaquera S., A. Patriarca G. Cabrera V.F. // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 148. № 4. P. 1003–1009.
159. Патент США. 1993. № 5256628.
160. Abbas H.K., Vessonderr F., Boyette C.D., Peterson S.W. // Can. J. Bot. 1993. V. 71. № 1. P. 155–160.
161. Abbas H.K., Egley G.H., Paul R.N. // Phytopathol. 1995. V. 85. № 6. P. 677–682.
162. Abbas H. // Phytochemistry. 1995. V. 40. № 6. P. 1681–1689.
163. Chen J., Mirocha C.J., Xie W., Hogge L., Olson D. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 12. P. 3928–3931.
164. De Bruyne L., Van Poucke C., Di Mavungu D.J., Zainuddin N.A.I.M., Vanhaecke L., De Vleeschauwer D., Höfte M. // Mol. Plant Pathol. 2015. V. 17. № 6. P. 805–817.
165. Lax A.R., Shepherd H.S., Edwards J.V. // Weed Technol. 1988. V. 2. № 4. P. 540–544.
166. Cavellier F., Verducci J., André F., Haraux F., Sigalat C., Traris M., Vey A. // Pestic. Sci. 1998. V. 52. № 1. P. 81–89.
167. Loiseau N., Cavellier F., Noel J.-P., Gomis J.-M. // J. Pept. Sci. 2002. V. 8. № 7. P. 335–346.
168. Li, Y.-H., Han, W.-J., Gui, X.-W., Wei, T., Tang, S.-Y., Jin, J.-M. // Toxins 2016. V. 8. № 8. P. 234.
<https://doi.org/10.3390/toxins8080234>
169. Патент WIPO. 2017. № 159795A1.
170. Stierle A.S., Cardellina J.H., Strobel G.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988. V. 85. № 21. P. 8008–8011.
171. Bobylev M.M., Bobyleva L.I., Strobel G.A. // J. Agric. Food Chem. 1996. V. 44. № 12. P. 3960–3964.
172. Патент США. 1990. № 4929270.
173. Marsico G., Ciccone M.S., Masi M., Freda F., Cristofaro M., Evidente A., Scafato P. // Molecules. 2019. V. 24. № 17. P. 3193.
<https://doi.org/10.3390/molecules24173193>
174. Solfrizzo M., Girolamo A.D., Vitti C., Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczęśna J., Szopińska D., Dorna H. // Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 2005. V. 22. № 4. P. 302–308.
175. Европейский патент. 2005. № 1849361 A1.
176. Chen S., Qiang S. // Pestic. Biochem. Phys. 2017. V. 143. P. 252–257.
177. Qiang S., Zhou B. // Am. Eurasian J. Environ. Agric. Sci. 2007. V. 26. P. 572–576.
178. Zhou B., Wang H., Meng B., Wei R., Wang L., An C., Chen S., Yang C., Qiang S. // Pest Manag. Sci. 2019. V. 75. P. 2482–2489.
179. Sharma S., Hameed S., Fatima Z. // Recent Pat. Biotechnol. 2016. V. 10. № 2. P. 167–174.
180. Dinic J., Podolski-Renic A., Stankovic T., Bankovic J., Pesic M. // Curr. Pharm. Des. 2015. V. 21. № 38. P. 5589–5604.
181. Huang C., Jin H., Song B., Zhu X., Zhao H., Cai J., Lin Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 93. № 2. P. 777–785.
182. Teiten M.H., Mack F., Debbab A., Aly A.H., Dicato M., Proksch P., Diederich M. // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. № 13. P. 3850–3858.
183. Liu B.-L., Tzeng Y.-M. // Biotechnol. Adv. 2012. V. 30. № 6. P. 1242–1254.
184. Yeh C.-T., Rao Y.K., Ye M., Wu W.-S., Chang T.-C., Wang L.-S., Tzeng Y.-M. // Toxicol. Appl. Pharm. 2012. V. 261. № 1. P. 31–41.
185. Huynh T.-T., Rao Y. K., Lee W.-H., Chen H.-A., Le T. D.-Q., Tzeng D. T.W., Yeh C.-T. // Toxicol. in Vitro. 2014. V. 28. № 4. P. 552–561.
186. Chao P.-Z., Chin Y.-P., Hsu I.-U., Liu C.-M., Yu Y.-C., Leung T.-K., Lin Y.-F. // Toxicol. in Vitro. 2013. V. 27. № 6. P. 1870–1876.
187. Heilos D., Röhl C., Pirker C., Englinger B., Baier D., Mohr T. et al. // Oncotarget. 2018. V. 9. № 39. P. 25661–25680.
188. Kwon H.J., Owa T., Hassig C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. V. 95. № 7. P. 3356–3361.
189. Togashi K., Kakeya H., Morishita M., Song Y.X., Osada H. // Oncol. Res. 1998. V. 10. № 9. P. 449–453.
190. Pang X., Lin X., Wang P., Zhou X., Yang B., Wang J., Liu Y. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 8. P. 280.
<https://doi.org/10.3390/md16080280>
191. Johann S., Rosa L.H., Rosa C.A. Perez P., Cisalpino P.S., Zani C.L., Cota B.B. // Rev. Iberoam. Micol. 2012. V. 29. № 4. P. 205–209.
192. Cimmino A., Pescitelli G., Berestetskiy A., Dalinova A., Krivorotov D., Tuzi A., Evidente A. // J. Antibiot. 2015. V. 69. № 1. P. 9–14.
193. Kwon H. J., Kim J.-H., Kim M., Lee J.-K., Hwang W.-S., Kim D.-Y. // Vet. Parasitol. 2003. V. 112. № 4. P. 269–276.
194. Cota B.B., Rosa L.H., Caligiorno R.B., Rabello A.L.T., Alves T.M.A., Rosa C.A., Zani C.L. // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 285. № 2. P. 177–182.
195. Bashyal B.P., Wellensiek B.P., Ramakrishnan R., Faeth S.H., Ahmad N., Gunatilaka A.A.L. // Bioorg. Med. Chem. 2014. V. 22. № 21. P. 6112–6116.
196. Zheng C.-J., Shao C.-L., Guo Z.-Y., Chen J.-F., Deng D.-S., Yang K.-L., Wang C.-Y. // J. Nat. Prod. 2012. V. 75. № 2. P. 189–197.
197. Chua S.W., Cornejo A., van Eersel J., Stevens C.H., Vaca I., Cueto M., Ittner L.M. // ACS Chem. Neurosci. 2017. V. 8. № 4. P. 743–751.
198. Zheng Z., Zhao Z., Li S., Lu X., Jiang M., Lin J., Xie W. // Mol. Pharm. 2017. V. 92. № 4. P. 425–436.
199. Патент KHP. 2012. № 103054843B.
200. García-Ruiz C., Cheng-Sánchez I., Sarabia F. // Org. Lett. 2015. V. 17. № 22. P. 5558–5561.
201. Podlech J., Cudaj J. // Synlett. 2012. V. 23. № 3. P. 371–374.
202. Frisvad J.C. // Front. Microbiol. 2015. V. 5. P. 773.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00773>

203. Andersen B., Sørensen J.L., Nielsen K.F., van den Ende B.G., de Hoog S. // Fungal Genet. Biol. 2009. V. 46. № 9. P. 642–656.
204. Andersen B., Hansen M. E., Smedsgaard J. // Phytopathology. 2005. V. 95. № 9. P. 1021–1029.
205. Lakshmi M.J., Chowdappa P., Mahmood R. // Indian Phytopath. 2014. V. 67. № 4. P. 374–382.
206. Patriarca A., da Cruz Cabral L., Pavicich M.A., Nielsen K.F., Andersen B. // Int. J. Food Microbiol. 2019. V. 291. P. 135–143.
207. Andersen B., Thrane U. // Mycotoxin Res. 1996. V. 12. № 2. P. 54–60.
208. Zwickel T., Kahl S.M., Rychlik M., Müller M.E.H. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01368>
209. Larsen T.O., Perry N.B., Andersen B. // Tetrahedron Lett. 2003. V. 44. № 24. P. 4511–4513.
210. Andersen B., Kroger E., Roberts R.G. // Mycol. Res. 2002. V. 106. № 2. P. 170–182.
211. Somma S., Amatulli M.T., Masiello M., Moretti A., Logrieco A.F. // Int. J. Food Microbiol. 2019. V. 293. P. 34–43.
212. Andersen B., Dongo A., Pryor B.M. // Mycol. Res. 2008. V. 112. № 2. P. 241–250.
213. Brun S., Madrid H., Gerrits Van Den Ende B., Andersen B., Marinach-Patrice C., Mazier D., De Hoog G.S. // Fungal Biol. 2013. V. 117. № 1. P. 32–40.
214. Орина А.С., Ганнибал Ф.Б., Мироненко Н.В., Левитин М.М. // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. № 1. С. 53–62.

***Alternaria* Fungi as Producers of Biologically Active Compounds and Bioherbicides**

A. A. Dalinova^a, D. R. Salimova^a, and A. O. Berestetskiy^{a,*}

^aAll-Russian Institute for Plant Protection, Saint-Petersburg, 196608 Russian Federation

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

In the last few decades more than 270 metabolites of *Alternaria* fungi have been reported, some of them display phytotoxic, antibiotic, antifungal, antiprotozoal activity. This review is devoted to synthesis up-to-date information about structure, biological activity and possible application of *Alternaria* metabolites in plant protection, pharmacology and chemotaxonomy. Some *Alternaria* fungi were suggested as mycoherbicide. The toxicology of application of *Alternaria* fungi as mycoherbicides is discussed.

Keywords: *Alternaria*, secondary metabolites, phytotoxins, mycoherbicides

УДК 579.873.21.083.182:574.22

ЭФФЕКТ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ В ОТНОШЕНИИ ПОКОЯЩИХСЯ И АКТИВНО РАСТУЩИХ ФОРМ *Mycobacterium smegmatis*

© 2020 г. М. О. Шлеева^{1, *}, А. П. Савицкий¹, В. Д. Никитушкин¹, И. Д. Соловьёв¹,
К. А. Трутнева¹, Я. С. Керученко¹, А. С. Капрельянц¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: margoshleeva@gmail.com

Поступила в редакцию 04.12.2019 г.

После доработки 17.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Исследована возможность уничтожения покоящихся микобактерий *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) с помощью фотодинамической инактивации (ФДИ), используя их способность запасать эндогенные порфирины в период перехода в состояние покоя. Покоящиеся клетки *Msm* получали при постепенном закислении среды роста в стационарной фазе в течение 14 сут при разных концентрациях ионов железа в среде, а также в присутствии 5-аминолевулиновой кислоты в среде роста. Клетки подвергали воздействию света с длиной волны 532 нм, испускаемой лазером LLD10 в течение 5–60 мин. Показано, что увеличение концентрации копропорфирина у *M. smegmatis* через 6 суток роста при оптимальной концентрации ионов железа 0.5 г/л коррелировало с началом снижения метаболической активности и образованием овоидных покоящихся форм. Покоящиеся бактерии были чувствительны к ФДИ и погибали через 15–30 мин освещения, в отличие от активных клеток. В присутствии 5-аминолевулиновой кислоты происходило усиление продукции уропорфирина как в активных, так и в покоящихся микобактериях, что сопровождалось повышением чувствительности к действию ФДИ. Полученные результаты выявляют перспективу использования ФДИ для борьбы с покоящимися формами возбудителя ТБ и латентной формой заболевания.

Ключевые слова: *Mycobacterium smegmatis*, порфирин, фотодинамическая инактивация, покоящиеся микобактерии

DOI: 10.31857/S0555109920030149

Туберкулез (ТБ) является одной из 10 основных причин смерти в мире. По данным ВОЗ в 2018 г. туберкулезом заболели 10 млн чел. в мире, и 1.5 млн чел. (в том числе 0.251 млн чел. с ВИЧ) умерли от этой болезни. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) по-прежнему представляет серьезную проблему для здравоохранения. По оценкам ВОЗ, в 2018 г. в мире выявлено 484000 заболевших туберкулезом, возбудитель которого обладал устойчивостью к рифампицину — самому эффективному препарату первой линии. Среди вновь выявленных больных ТБ в 2018 г. в 78% диагностировали МЛУ-ТБ. Около одной четверти населения мира имеют латентный туберкулез. Риск того, что инфицированные туберкулезными бактериями заболеют туберкулезом, составляет 5–15%. Однако люди с ослабленной иммунной системой, такие как ВИЧ-инфицированные, а также неполноценно питающиеся или курящие подвергаются гораздо более высокому риску заболевания. Без надлежащего лечения в среднем 45% ВИЧ-нега-

тивных людей с туберкулезом и почти все ВИЧ-позитивные люди с туберкулезом погибают.

Возбудитель ТБ — *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) способен в неблагоприятных условиях образовывать покоящиеся формы, которые не только приобретают устойчивость ко всем известным антибактериальным препаратам, но и способны десятилетиями сохранять жизнеспособность в организме человека и переходить в активное состояние, вызывая возобновление болезни. Несмотря на недавние многочисленные исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе перехода активных микобактерий в состояние покоя, мало известно об особенностях метаболических процессов, протекающих в покоящихся микобактериях. Исходя из того, что в состоянии покоя в бактериях происходит торможение метаболизма, включающее ингибирование многих ферментов и биохимических путей, можно ожидать внутриклеточного накопления некоторых промежуточных метаболитов, таких как метаболиты немевалонатного пути биосинтеза терпеноидов [1]. В недавней работе [2] бы-

ло показано накопление в значительных количествах промежуточных продуктов биосинтеза протопорфиринов — ключевых молекул гем-содержащих ферментов. Быстрорастущий родственник возбудителя ТБ — *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) способен накапливать эндогенно свободные порфирины, такие как копропорфирин III и уропорфирин III, а также их метиловые эфиры [2] во время перехода в покоящееся состояние. В протеомном профиле покоящихся клеток *Msm* обнаружено увеличение количества ферментов синтеза порфирина: порфибилиногендеаминаза, дегидратаза дельта-аминолевулиновой кислоты, декарбоксилаза уропорфириногена, в отличие от активных микобактерий [3].

Это необычное явление требует дальнейшего исследования для установления особенностей структуры накопленных порфиринов, характеристики ферментов, участвующих в их синтезе и причин этого явления. С другой стороны, возможное накопление порфиринов в условиях покоя *Mtb* может быть использовано для фотодинамической инактивации (ФДИ) таких форм и лечения латентного ТБ. До настоящего времени накопление покоящимися микобактериями порфиринов до сих пор не было исследовано.

Цель работы — изучение накопления порфиринов при переходе активных *Msm* в покоящееся состояние, а также оценка эффективности фотодинамической инактивации покоящихся микобактерий.

МЕТОДИКА

Образование покоящихся форм *M. smegmatis*.

Клетки *M. smegmatis* штамма mc²155 выращивали в питательном бульоне (NB) (“Himedia”, Индия) при 37°C в течение 24 ч при перемешивании (200 об./мин). Инокулят (1 мл) добавляли к 100 мл среды Сатона, следующего состава (г/л): K₂HPO₄ — 0.5; MgSO₄ · 7H₂O — 1.4; L-аспарагин — 4.0; цитрат аммония трехвалентного железа — 0.05; цитрат Na — 2.0; ZnSO₄ — 0.01 (“Sigma Aldrich”, США) и глицерин (“Panreac”, Испания) — 60 мл, pH 6.0, вместо обычного для этой среды pH 7.0. Для предотвращения агрегации клеток добавляли Твин 80 (конечная концентрация 0.05%). Культуру выращивали при 37°C на качалке (200 об./мин) в течение 13–16 сут, пока не установится значение pH среды ~ 6.0 [4].

Оценка жизнеспособности по КОЕ. Бактериальные суспензии покоящихся, активных и освещенных микобактерий серийно разводили в свежей среде Сатона, и затем по три пробы 10 мкл из каждого разведения наносили на агаризованную среду NB (“Himedia”, India). Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 5 сут, затем подсчиты-

вали количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Предел обнаружения составил 10 КОЕ/мл.

Определение метаболической активности клеток методом мониторинга включения ³H-урацила. Культуры активных и покоящихся клеток *M. smegmatis* (1 мл) инкубировали с 1 мкл [5.6-³H] урацила (конечная молярная активность — 1 мкКи/0.02 мкмоль) в течение 4 ч при 37°C на шейкере (45–60 об./мин). Клетки собирали на GFC-фильтрах из стекловолокна (“Whatman”, Англия), промывали 3 мл 7%-ной трихлоруксусной кислоты, а затем 3 мл абсолютного этанола. Высушенные на воздухе фильтры помещали в сцинтилляционную жидкость, радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике LS6500 (“Beckman”, США).

Экстракция пигмента из клеток. Пигмент экстрагировали из биомассы бактерий по методу Блая и Дайера [5]. К влажной биомассе (0.8 г) добавляли 1.0 мл хлороформа и 2.0 мл метанола, клетки перемешивали в течение 2 ч, затем центрифугировали при 2500 g в течение 20 мин и к надосадочной жидкости добавляли 1.0 мл воды и 1.0 мл хлороформа (для разделения фаз). Слой хлороформа трижды промывали 0.1 М NaCl и затем анализировали методом ВЭЖХ (Аквион, “Стайер”, Россия).

Определение порфирина методом ВЭЖХ. Хлороформные экстракт, содержащий порфирины, анализировали методом ВЭЖХ; использовали колонку размером 4.6 × 250 мм с сорбентом Kromasil 100-5 C18 (“Akzo Nobel”, Швеция); в градиентном режиме с буфером А (30%-ный водный CH₃CN) и буфером В (100% CH₃CN); скорость потока, 1 мл/мин, объем образца 50 мкл. Копропорфирин III и протопорфирин IX (Calbiochem, США) были использованы в качестве стандартов. Длина волны регистрации — 400 нм.

Фотодинамическая инактивация. Для экспериментов по инактивации светом использовали суспензии покоящихся или активных клеток *Msm* с ОП = 0.1, что соответствовало ~10⁷ бактерий в мл. В лунки 96-луночного планшета Nunc (“ThermoFisher Scientific”, США) вносили по 100 мкл суспензий бактерий. Образцы освещали с помощью лазера LLD10 (“ATC Semiconductor Devices”, Россия) при 532 нм. Плотность мощности света определяли с помощью измерителя мощности 2936-с (“Newport”, США). Световой пучок коллимировали до диаметра 5 мм, что соответствовало диаметру лунок 96-луночного планшета. Освещали в течение 5, 15, 30 или 60 мин. Температурный контроль осуществлялся с помощью мультиметрического термопарного датчика 80BK типа К (“Fluke”, Германия) непосредственно в микроячейке до и после освещения, а также в присутствии и без суспензии *M. smegmatis* с точностью ±0.2°C. Температура была ниже 40°C в лунках в течение всех

экспериментов. После освещения образцов десятикратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) высевали на чашки с агаризованным МПБ для определения КОЕ. Инкубацию проводили при 37°C в течение 5 сут.

Микроскопия. Фазово-контрастную эпифлуоресцентную микроскопию осуществляли с использованием микроскопа Eclipse Ni-U (“Nikon”, Япония) при увеличении $\times 1500$. Эпифлуоресцентную микроскопию проводили в “канале TRITC” ($\text{Ex} = 540/25$; $\text{DM} = 565$; $\text{BA} = 605/55$). Фотографии были сделаны с помощью камеры DS Qi2 (“Nikon”, Япония). Конечная концентрация добавленного к клеткам йодида пропидия (PI) 1 мкг на мл.

Проточная цитометрия. Для количественной оценки бактериальных клеток, окрашенных PI (пропидий йодид) использовали проточный цитометр FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США). Анализировали распределение клеток в координатах SSC-H ~ FL3 (регистрировалось 10000 клеток со скоростью записи 1000 клеток/с). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения FlowJo LLC (“Орегон”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальных моделях образования покоящихся форм микобактерий *in vitro* показано, что такие клетки обладают низкой активностью метаболизма и устойчивостью к известным противотуберкулезным препаратам [6]. Действие многих антибиотиков основано на ингибировании таких основных биосинтетических путей, как синтеза белка, нуклеиновых кислот или полимеров клеточной стенки, что в конечном счете приводит к гибели бактерий. Покоящиеся бактерии с незначительной метаболической активностью могут избежать действия таких “биохимических блокаторов” несмотря на то, что они все еще содержат подходящую мишень. Можно предположить, что эффект полного подавления жизнеспособности покоящихся “некультивируемых” микобактерий может быть обеспечен другим типом противомикробных препаратов, вызывающих прямое вредное воздействие на бактериальную клетку [6]. Такие соединения могут модифицировать внутриклеточные компоненты путем алкилирования, гидролиза, восстановления/окисления и т.д. Так, 2-тиопиридины способствуют транспорту Cu^{++} и накоплению этого иона в токсичных концентрациях в клетке путем формирования стабильного заряженного комплекса [7], что приводит к стерилизующему эффекту в отношении покоящихся форм *Mtb*. Подобный эффект наблюдался в отношении покоящихся микобактерий при использовании полидиаллиламинов, вызывающих деструкцию клеточной стенки [8].

Обнаруженное ранее явление накопления свободных и метилированных порфиринов в покоящихся микобактериях [2] может быть использовано для проведения их фотодинамической инактивации. Среди имеющихся в настоящий момент фотосенсибилизаторов (ФС) у порфирина и его аналогов имеются следующие преимущества: 1) многие из них являются эффективными продуцентами синглетного кислорода; 2) они обычно не генерируют синглетный кислород в отсутствие света; 3) имеют заметное поглощение в красной области оптического спектра; 4) они относительно стабильны. В настоящей работе была проведена экспериментальная проверка влияния фотодинамической инактивации на жизнеспособность покоящихся форм *Msm*.

Бактерии *M. smegmatis*, выращенные в среде Сатона, в условиях постепенного подкисления среды роста, образовали покоящиеся клетки овоидной формы после 14 сут культивирования. Появление овоидных клеток в популяции сопровождалось снижением метаболической активности, о чем свидетельствует уменьшение включения H^3 -урацила, в то время как КОЕ в культуре оставалась почти постоянной в течение 30 сут. Также такие формы микобактерий имели низкую дыхательную активность и были значительно менее чувствительны к ингибированию синтеза РНК (рифампицин) и белка (гигромицин) или H^+ АТФазы (бедаквилин) (табл. 1). В таких покоящихся клетках *Msm* было обнаружено накопление значительного количества уропорфирина/копропорфирина и их метильных производных [2]. Поскольку порфирины являются предшественниками гема, для синтеза которого также требуются ионы железа, можно предположить, что концентрация железа внутри клетки может влиять на скорость синтеза предшественников гема. Была проанализирована динамика внутриклеточного накопления порфиринов при переходе микобактерий в состояние покоя в среде Сатона, содержащей разные количества ионов Fe^{3+} в диапазоне от 0 до 3.2 г/л цитрата железа (III)-аммония ($(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$), остальные компоненты среды добавляли в неизменной концентрации. В норме количество цитрата железа (III)-аммония составляло 0.05 г/л среды. Наибольшая интенсивность накопления веществ порфириновой структуры (до 1.2 мкМ против 0.4 мкМ при стандартной концентрации железа) была обнаружена при концентрации цитрата железа (III)-аммония, соответствующей 0.5 г/л (рис. 1). При отсутствии железа микобактерии не переходят в покоящуюся форму (рис. 2). Микроскопические исследования показали, что при отсутствии железа овоидные формы микобактерий не образуются, клетки продолжали делиться и были представлены тонкими длинными палочками (рис. 2). При этом закисления внеш-

ней среды в стационарной фазе роста культуры не наблюдалось. При концентрации цитрата железа (III) аммония 0.05 и 0.5 г/л появлялись типичные овоидные формы клеток, которые ассоциированы с состоянием покоя у микобактерий, в этих случаях происходило самозакисление окружающей среды до значений 5.6–6.2. При концентрации цитрата аммонийного железа (III) 1.3 и 3.2 г/л наблюдалось сильно выраженная гетерогенность клеток в культуре, при которой наряду с овоидными клетками присутствовали и короткие палочки. Увеличение концентрации копропорфирина в стационарной фазе (после 6 сут роста) коррелировало с постепенным подкислением культуры, началом снижения метаболической активности и образованием овоидных покоящихся форм (табл. 2).

Для увеличения внутриклеточной концентрации порфиринов в микобактериях была использована 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), которую добавляли в среду выращивания. В этом случае наблюдалось увеличение внутриклеточной концентрации неметилованных порфиринов (уропорфирина) в бактериях стационарной фазы развития культуры и в покоящихся микобактериях (табл. 3), но не в клетках логарифмической фазы роста (не показано). Анализ экстрагированных порфиринов из активных и покоящихся клеток, выращенных в присутствии АЛК, методом ВЭЖХ показал, что в присутствии избытка АЛК в среде наблюдалось уменьшение продукции метилированной формы копропорфирина и увеличение количества уропорфирина (табл. 3).

Было изучено влияние света с длиной волны 532 нм (совпадает с максимумом поглощения порфиринов в видимой области [2]) на жизнеспособность

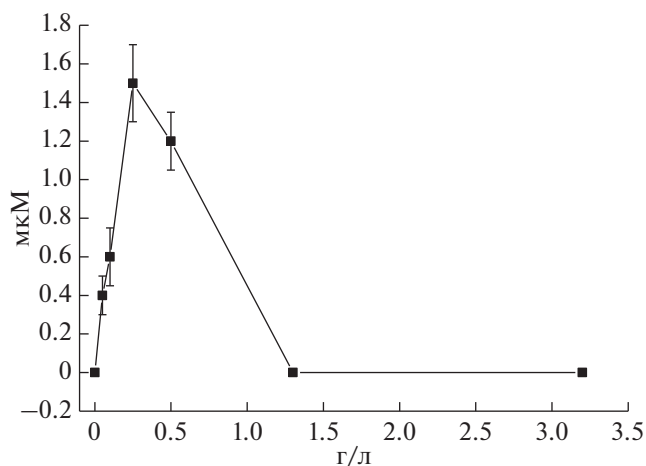


Рис. 1. Влияние концентрации железа на продукцию порфиринов в процессе образования покоящихся микобактерий. На оси абсцисс — концентрация железа в (г/л). На оси ординат — концентрация экстрагированных из клеток *M. smegmatis* порфиринов в (мкМ).

способностью активных и покоящихся форм микобактерий, выращенных в присутствии 3.0 мМ АЛК и без нее (рис. 3). Наибольшее снижение выживаемости микобактерий наблюдалась при воздействии света на покоящиеся микобактерии, выращенные в присутствии АЛК (снижение показателя в 1000 раз при 30 мин освещения), в случае воздействия света на покоящиеся микобактерии, выращенные без добавления АЛК также отмечалось значительное снижение выживаемости клеток в 100 раз (рис. 3а), что косвенно подтвердило накопление порфиринов в покоящихся клетках

Таблица 1. Свойства активных и покоящихся клеток *M. smegmatis*

Параметр	Активные клетки	Покоящиеся клетки
Размер клетки, длина/ширина, мкм	$3.43 \pm 1.05/0.61 \pm 0.06$	$1.42 \pm 0.35/0.55 \pm 0.08$
Скорость включения H^3 -урацила при 37°C, СРМ/мг влажного веса клеток	21383 ± 3401	646 ± 13
Скорость включения H^3 -урацила при 25°C, СРМ/мг влажного веса клеток	6036 ± 793	30 ± 5
Активность дыхания:		
Активность ДФИ-редуктазы, ОП ₆₀₀ /мин ⁻¹ мг ⁻¹	0.18 ± 0.01	0.01 ± 0.005
Потребление кислорода, нмоль O ₂ мин ⁻¹ мг ⁻¹	20 ± 4.5	$2.5 \pm .075$
АТФ, пкмоль × влажного веса клеток ⁻¹	82 ± 13	10 ± 2
Устойчивость к рифампицину, %*	0.02 ± 0.007	62.5 ± 17.8
Устойчивость к гигромицину, %*	0.0001 ± 0.00005	10 ± 2
Устойчивость к бедаквилину, %*	1.4 ± 0.5	30.8 ± 9.2

*Количество клеток в популяции, устойчивых к обработке гигромицином (100 мкг/мл), рифампицином (50 мкг/мл) и бедаквилином (50 мкг/мл) было выявлено из соотношения значений НВЧК до и после обработки клеток антибиотиками.

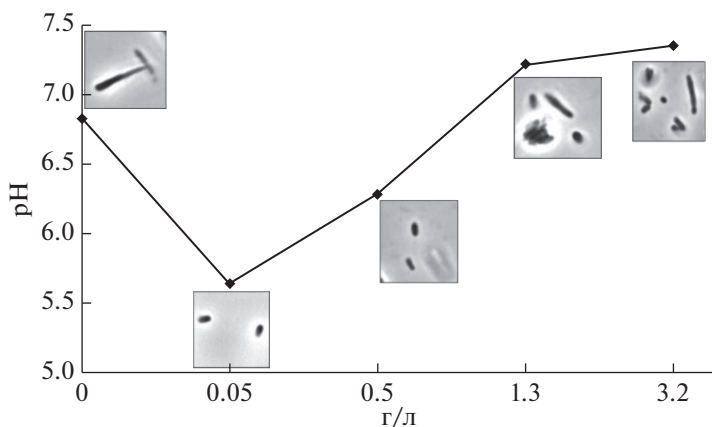


Рис. 2. Изменение значений pH и морфологии бактерий в процессе перехода в состояние покоя клеток *Msm* при разных концентрациях железа в среде роста.

Msm. В дальнейшем изучали влияние времени воздействия света с λ 532 нм на жизнеспособность клеток *Msm* трех типов: 1) клетки логарифмической фазы роста, выращенные в присутствии 3.0 мМ АЛК в течение 18 ч; 2) клетки ранней стационарной фазы роста (27 ч); 3) клетки ранней стационарной фазы роста, выращенные в течение 27 ч в присутствии АЛК (рис. 3б). При облучении лазером с λ 532 нм в течение 15 мин активные бактерии ранней стационарной фазы роста, выращенные в присутствии АЛК, быстро погибали, при этом КОЕ с 10^7 уменьшалось до 2×10^4 , в отличие от двух других вариантов культур; продолжение освещения не приводило к дальнейшему снижению КОЕ (рис. 3б).

ВЭЖХ-анализ порфиринов, экстрагированных из освещенных покоящихся микобактерий, выявил выраженное уменьшение пика (20 мин), соответствующего копропорфинам, и появление дополнительного пика (23.5 мин, не показана), что, очевидно, связано с накоплением фото-

модифицированной формы порфиринов.

Чтобы проанализировать возможное разрушение клеток после светового воздействия, накопление поврежденных клеток оценивали методом проточной цитометрии с помощью окрашивания иодидом пропидия, который формирует флуоресцентный комплекс с ДНК при повреждении барьера проницаемости клеток бактерий. Типичная картина распределения неокрашенной пробы клеток микобактерий, включающая в себя популяцию живых и мертвых клеток продемонстрирована на рис. 4 (проба без красителя). Однако, если к этой пробе добавить ДНК-связывающийся краситель PI, который связывается с исключительно поврежденными (мертвыми) бактериальными клетками, интенсивность сигнала FL3 (красная флуоресценция) значительно возрастала, особенно для образца, предварительно освещенного лазером. Наложение точечных диаграмм окрашен-

Таблица 2. Концентрации порфиринов в клетках *M. smegmatis* при переходе в состояние покоя

Время, сут	pH	Тетраметил-копропорфин в CHCl_3 , ммоль/г влажного веса клеток	Копропорфин в CH_3OH , ммоль/г влажного веса клеток
2	6.65	24.32 ± 4.5	0.16 ± 0.01
3	7.27	34.61 ± 5.0	0.93 ± 0.1
4	7.58	67.55 ± 5.5	0.57 ± 0.04
5	7.64	76.11 ± 4.2	1.05 ± 0.08
6	7.47	200.43 ± 7.5	1.14 ± 0.1
7	7.15	194.5 ± 14.6	1.23 ± 0.11
8	7.03	272.74 ± 8.5	0.53 ± 0.06
9	6.6	312.93 ± 10.5	0.48 ± 0.03
10	6.3	307.03 ± 6.5	0.35 ± 0.03
11	6.18	286.07 ± 10.2	0
12	6.23	402.64 ± 7.5	0

ных и неокрашенных клеток позволило выявить клетки с красной флуоресценцией, а следовательно, установить процент поврежденных клеток. Цитометрия неосвещенных клеток в присутствии иодида пропидия выявила некоторое количество поврежденных бактерий ($33.3 \pm 3.3\%$) (рис. 4), которые отражают существование нежизнеспособных клеток даже в неэкспонированной культуре. На рис. 4б показано увеличение количества поврежденных клеток сразу же после воздействия света по сравнению с неосвещенными клетками. По данным проточной цитометрии, после 30 мин воздействия света около 60 процентов ($58.73 \pm 4.9\%$) клеток были повреждены.

Таким образом, в данном исследовании выявлено, что освещение бактерий лазерным светом приводило к инактивации микобактерий, находящихся в стадии покоя, в противоположность активным бактериям логарифмической фазы роста (рис. 3). Очевидно, что снижение выживаемости бактерий под действием света действительно связано с накоплением порфиринов, поскольку введение АЛК в среду роста стимулировало выработку порфиринов (табл. 3) и повышало чувствительность клеток к освещению (рис. 3). Ранее стимуляция синтеза порфиринов под действием АЛК была описана для культур *Mycobacterium phlei* и *M. smegmatis* [9], но фотодинамическое действие эндогенных порфиринов в отношении микобактерий не оценивалось.

Хотя большинство клеток (около 99%) в исследованных популяциях были высокочувствительными к освещению, менее 1.0% клеток были либо устойчивы к освещению при 532 нм, либо значительно менее чувствительны к нему (рис. 3). Одной из причин возникновения остаточной устойчивости клеток к освещению может быть “эффект фильтра”, когда свет рассеивается клетками в суспензии, что приводит к снижению световой дозы в глубоких слоях образца. Гетерогенность клеток в популяции, содержащих различное количество порфиринов, также может объяснять этот эффект. Интересно, что оценка количества поврежденных и, очевидно, нежизнеспособных клеток сразу же после освещения методом про-

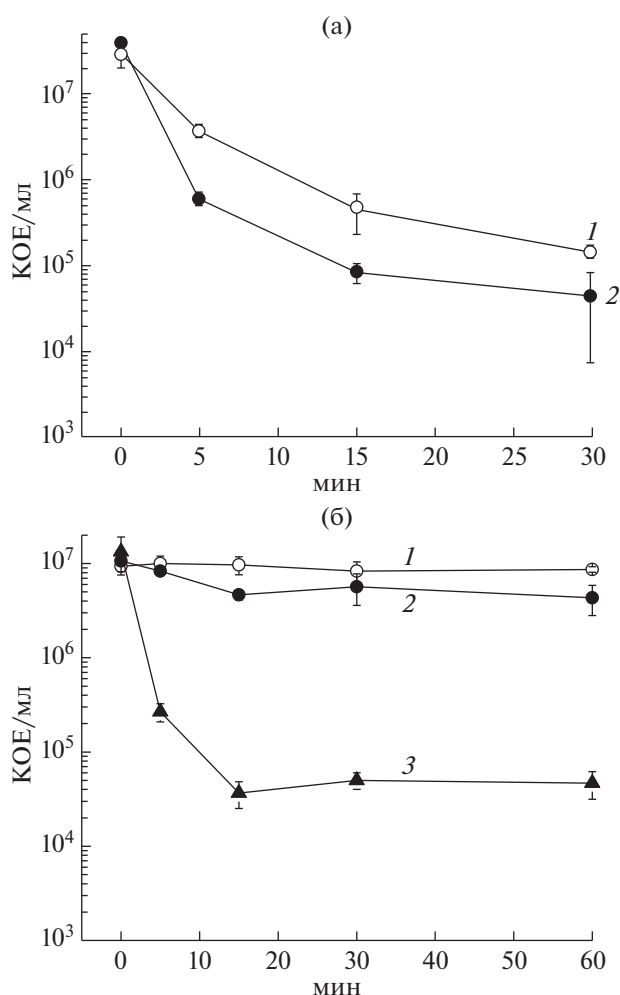


Рис. 3. Влияние света $\lambda = 532$ нм на выживаемость клеток покоящихся (а) и активных (б) клеток *Msm*, выращенные с добавлением АЛК (2) и без нее (1). б – 1, 2 – выращивание 18 ч, 3 – 27 ч.

точной цитометрии (рис. 4) выявляет значительную часть популяции как неповрежденную (около 40%). Последнее означает, что в популяции действительно присутствуют высокочувствительные к освещению клетки и менее чувствительные. Однако последние также содержат опреде-

Таблица 3. Содержание порфиринов в активных и покоящихся клетках *M. smegmatis*, выращенных в присутствии 5-аминолевулиновой кислоты и без нее

Вариант опыта	Метилированный копропорфирин (экстракция ацетоном и аммиаком), мкг/мг влажного веса клеток	Уропорфирин (экстракция хлороформом и метанолом с водой), мкг/мг влажного веса клеток
Покоящиеся <i>Msm</i>	0.575 ± 0.08	0.00345 ± 0.0001
Покоящиеся <i>Msm</i> + АЛК	0.305 ± 0.008	0.14 ± 0.014
Активные <i>Msm</i>	0.04667 ± 0.006	0.02233 ± 0.002
Активные <i>Msm</i> + АЛК	0.07667 ± 0.006	0.11767 ± 0.011

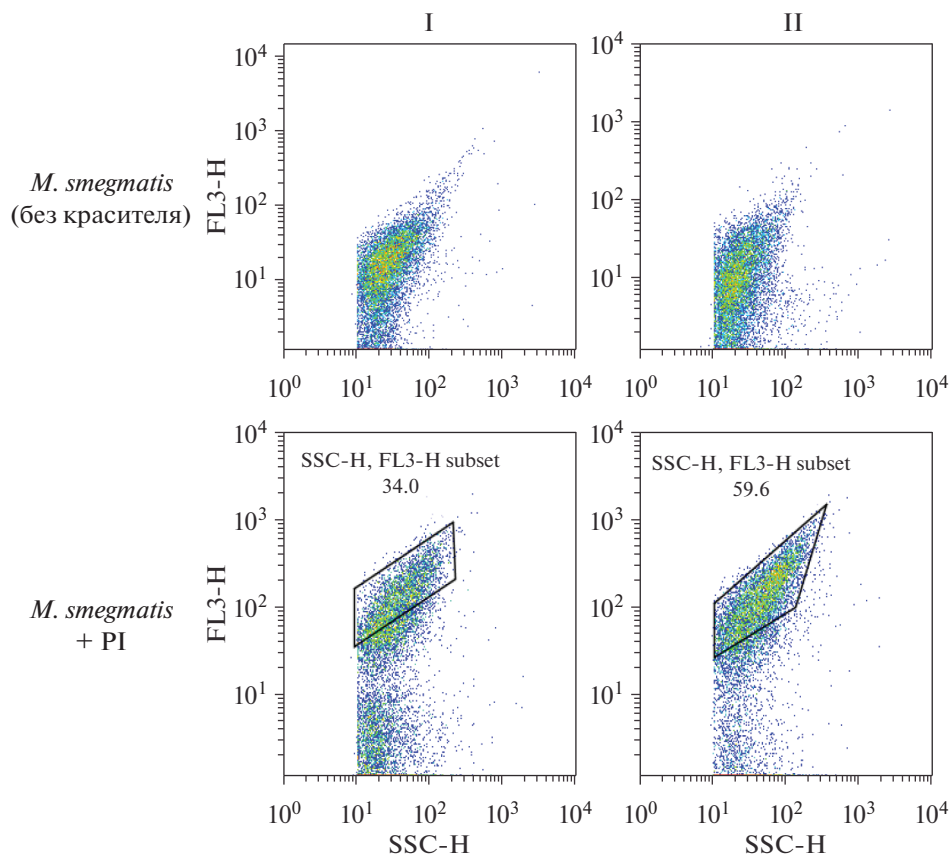


Рис. 4. Анализ количества поврежденных клеток *M. smegmatis* после освещения лазером с длиной волны 532 нм методом проточной цитометрии. I — контроль (неосвещенные клетки); II — освещенные клетки. Диаграммы распределения построены в координатах: по оси абсцисс SSC-H (боковое рассеяние света), по оси ординат FL3 (красная флуоресценция). На диаграммах распределения полигоном отмечена популяция клеток, окрашиваемых по PI, которая соответствует доли поврежденных клеток.

ленные повреждения, которые приводят в конечном итоге к гибели около 99% клеток.

Полученные нами результаты согласуются с исследованиями, в которых описывается возможность фотодинамической инактивации микобактерий в основном при помощи экзогенно добавленных ФС. Так, Санг с соавт. продемонстрировали возможность фотоинактивации штаммов *Mtb* с множественной лекарственной устойчивостью с применением экзогенно введенного фотосенсибилизатора радахлорина *in vitro* [10]. Ранее было показано, что *Mycobacterium bovis* BCG [11], *M. marinum* [12], *M. fortuitum* [13] могут быть инактивированы путем фотодинамического воздействия с применением экзогенно добавленных порфиринов, как *in vitro*, так и *in vivo*. Применение катионных ФС порфириновой природы приводило к значительному снижению числа жизнеспособных клеток *M. smegmatis* при ФДИ белым светом в экспериментах *in vitro* [14]. Иногда в качестве таких экзогенно добавленных фотосенсибилизаторов используют вещества порфириновой структуры. Так, для фотодинамической инактивации зо-

лотистого стафилококка применяли порфирины, связанные с циклодекстрином [15].

Работы, в которых использовались эндогенные ФС для инактивации клеток бактерий, находящихся в состоянии покоя, ранее не проводились. Обнаруженный нами факт накопления эндогенных порфиринов в процессе перехода микобактерий в состояние покоя является уникальным и расширяет горизонты для использования фотодинамической терапии в отношении возбудителя туберкулеза.

В настоящем исследовании впервые показана возможность фотоинактивации *in vitro* активных и покоящихся форм микобактерий на примере быстрорастущего родственного возбудителя туберкулеза *Msm* штамма. Таким образом, настоящее исследование выявляет перспективу использования ФДИ для борьбы с покоящимися формами возбудителя ТБ и латентной формой заболевания.

Эксперименты по проведению фотодинамической инактивации микобактерий были проведены при поддержке гранта РНФ № 19-15-00324. Харак-

теристика покоящихся микобактерий проведена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-00245.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trutko S.M., Shcherbakova V.A., Ivanova I.V., Lysanskaya V.Ya., Arkhipova O.V., Chuvil'skaya N.A., Baskunov B.P., Ostrovskii D.N., Akimenko V.K. // Microbiology. 2008. V. 77. № 3. P. 261–267.
2. Nikitushkin V.D., Shleeve M.O., Zinin A.I., Trutneva K.A., Ostrovsky D.N., Kaprelyants A.S. // FEMS Microbiol. Lett. 2016. V. 363. № 19. P. 1–8.
3. Trutneva K., Shleeve M., Nikitushkin V., Demina G., Kaprelyants A. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 2083.
4. Кудыкина Ю.К., Шлеева М.О., Арцатбанов В.Ю., Сузина Н.Е., Капрельянц А.С. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 625–636.
5. Bligh E., Dyer W.J. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. № 8. P. 911–917.
6. Kaprelyants A., Salina E., Makarov V. // Int. J. Mycobacteriology. 2018. V. 7. P. 399–400.
7. Salina E.G., Huszár S., Zemanová J., Keruchenko J., Ribabova O., Kazakova E., Grigorov A., Azhikina T., Kaprelyants A., Mikušová K., Makarov V. // Metallomics. 2018. V. 10. № 7. P. 992–1002.
8. Timofeeva L.M., Kleshcheva N.A., Shleeve M.O., Filatova M.P., Simonova Y.A., Ermakov Y.A., Kaprelyants A.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. № 6. P. 2557–2571.
9. Bruce-Micah R., Hüttenberger D., Freitag L., Cullum J., Foth H.J. // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2009. V. 97. № 1. P. 1–7.
10. Sung N., Back S., Jung J., Kim K.H., Kim J.K., Lee J.H., Ra Y., Yang H.C., Lim C., Cho S., Kim K., Jheon S. // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2013. V. 10. № 4. P. 694–702.
11. O'Riordan K., Sharlin D.S., Gross J., Chang S., Errabelli D., Akilov O.E., Kosaka S., Nau G.J., Hasan T. // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. V. 50. № 5. P. 1828–1834.
12. Wiegell S.R., Kongshoj B., Wulf H.C. // Arch. Dermatol. 2006. V. 142. № 9. P. 1241–1242.
13. Shih M.H., Huang F.C. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. V. 52. № 1. P. 223–229.
14. Feese E., Ghiladi R.A. // J. Antimicrob. Chemother. 2009. V. 64. № 4. P. 782–785.
15. Hanakova A., Bogdanova K., Tomankova K., Pizova K., Malohlava J., Binder S., Bajgar R., Langova K., Kolar M., Mosinger J., Kolarova H. // Microbiol. Res. 2014. V. 169. № 2–3. P. 163–170.

The Effect of Photodynamic Inactivation Against Dormant Forms and Active Growing Cells of *Mycobacterium smegmatis*

M. O. Shleeve^{a,*}, A. P. Savitsky^a, V. D. Nikitushkin^a, I. D. Soloviev^a,
K. A. Trutneva^a, Ya. S. Keruchenko^a, and A. S. Kaprelyants^a

^aBach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre ‘Fundamentals of Biotechnology’ of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: margoshleeve@gmail.com

The causative agent of tuberculosis (TB) — *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is able to form dormant forms under adverse conditions, which not only acquire resistance to all known antibacterial drugs, but are also able to remain viable in the human body for decades and go into an active state, causing the disease to resume. To solve the problem of latent TB, it is necessary to develop new approaches. Earlier, we discovered the accumulation of significant concentrations of porphyrins in the dormant culture of *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*), which is a close, rapidly growing relative of the causative agent of tuberculosis. In this work, we investigated a new possibility of killing dormant mycobacteria using photodynamic inactivation (PDI) based on stored porphyrins as endogenous photosensitizers (PS). The dormant *Msm* cells were obtained under gradually acidification of the growth medium in the stationary phase for 14 days at different concentrations of culture medium in stationary phase during 14 days under different concentrations of ferric ions and presence of 5-aminolevulinic acid in the growth medium. Cells were exposed to light with a wavelength of 532 nm emitted by an LLD10 laser for 5–60 min. An increase in the concentration of coproporphyrin in *M. smegmatis* after 6 days of growth correlated with the onset of a decrease in metabolic activity in cells and the formation of ovoid dormant forms. The dormant bacteria were sensitive to PDI and were destroyed after 15–30 min of illumination, in contrast to active cells. In the presence of 5-aminolevulinic acid and optimum concentration of ferric ions (0.5 mg/L), there was an increase in the production of uroporphyrin in both active and dormant mycobacteria, which was accompanied by an increase in sensitivity to the action of PDI. Obtained results open a new approach for the killing of dormant mycobacteria and to combat latent tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*, porphyrin, photodynamic inactivation, dormant mycobacteria

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПЕПТИДА – ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНА А, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ *Emericellopsis alkalina*, В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2020 г. В. С. Садыкова^{1,2,*}, И. А. Гаврюшина^{1,2}, А. Е. Куварица^{1,2}, Н. Н. Маркелова^{3,4},
Н. Г. Седых⁴, М. Л. Георгиева^{1,5}, А. С. Барашкова², Е. А. Рогожин^{1,2,6}

¹Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997 Россия

³Российский научный центр рентгенодиагностики Минздрава России, Москва, 117997 Россия

⁴Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 111123 Россия

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

⁶Тюменский государственный университет, Тюмень, 625003 Россия

*e-mail: sadykova_09@mail.ru

Поступила в редакцию 12.11.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Изучена антимикробная активность нового нерибосомального пептида эмерициллипсина А в отношении биопленкообразующих патогенных грамположительных и грамотрицательных клинических бактерий. Впервые показана для пептидов из группы пептаиболов способность к ингибированию патогенных бактерий, образующих биопленки. Наиболее выраженный эффект был продемонстрирован в отношении грамположительных форм, что определяет специфичность антибактериального действия данного пептида.

Ключевые слова: биопленкообразующие бактерии, антимикробные пептиды, эмерициллипсин А, алкалофильные грибы, *Emericellopsis alkalina*, ингибирование образования биопленок

DOI: 10.31857/S0555109920030101

Во всем мире серьезную угрозу здоровью населения представляют инфекционные заболевания, микроорганизмы-возбудители которых способны к образованию биопленок, являющихся одновременно фактором патогенности и резистентности бактерий. Необходимо отметить, что такие бактерии составляют ~80% всех патогенных видов [1]. Инфекции, при которых образуются биопленки, с трудом поддаются лечению, поскольку обладают высокой устойчивостью ко многим антибиотикам и антимикробным препаратам, применяемым в клинической медицине, а также способностью преодолевать защитные механизмы макроорганизмов [1, 2]. Установлено, что резистентность возбудителей в составе биопленки возрастает во много раз по сравнению с планктонными микроорганизмами, поскольку за счет ее матрикса фактически создается так называемый защитный барьер, препятствующий эффективному контакту действующего вещества с клетками-мишенями [3]. В последнее время активно разрабатываются новые подходы к выявлению и изучению биопленок,

меняется тактика антибиотикотерапии, а также ведется поиск новых антибиотиков, ингибиторов межклеточной сигнализации, ферментов и других методов разрушения уже сформировавшихся биопленок. В число наиболее опасных инфекционных биопленкообразующих бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний включены грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus* spp. с множественной лекарственной устойчивостью. Среди грамотрицательных бактерий – возбудителей госпитальных инфекций наибольшую опасность представляют *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*.

Эти патогенные микроорганизмы преимущественно обнаруживаются в больничной среде и демонстрируют режим выживания с множественной лекарственной устойчивостью, который усложняет антимикробную терапию с использованием конвенциональных антибиотиков [4, 5].

Антимикробные пептиды (АМП) в последнее десятилетие вызывают наибольший интерес и являются основными кандидатами в области поис-

ка и разработки, альтернативных традиционным, лекарственных средств для борьбы с микроорганизмами – возбудителями инфекционных заболеваний, в том числе вызываемых штаммами бактерий, образующими биопленки. На сегодняшний день все зарегистрированные природные и синтетические АМП собраны в различных базах данных, например, в хранилище данных антимикробных пептидов (DRAMP), которое содержит более 4500 последовательностей [6]. АМП, выделенные из различных источников, активно изучаются, в том числе, как соединения, действующие на биопленки патогенных бактерий. В течение последнего десятилетия ряд АМП, выделенных из животных, показал антибиопленочную активность по отношению к патогенным видам бактерий, приводящую либо к ингибированию формирования, либо к разрушению уже образовавшейся биопленки. Одним из первых пептидов, обладающих антибиопленочной активностью, был кателицидин человека LL-37 [7]. Этот линейный пептид является одним из наиболее изученных, в субингибирующих концентрациях проявляющих антибиопленочную активность по отношению к планктонному виду *Pseudomonas aeruginosa* [8]. Примечательно, что данный пептид практически не обладает ингибирующей активностью в отношении планктонных бактерий, но проявляет специфическое антибиопленочное действие. Был проведен ряд исследований, показавших, что обработка стафилококков антимикробными тромбоцитарными пептидами способствует изменению их физико-химических свойств (гидрофиллизация поверхности и повышение электрокинетического потенциала) и снижению биопленкообразования [9]. Так, врожденный защитный регуляторный пептид IDR-1018, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота, показал широкий спектр действия в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенов, образующих биопленки [10].

Следует отметить, что АМП природного происхождения, выделенные из грибов, являются одними из важнейших, активно изучаемых источников новых эффективных антибиотиков. Им свойственны широкий спектр действия в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов, как правило, низкая токсичность, к ним не формируется резистентность. При этом они обладают способностью ингибировать рост микроорганизмов, во многих случаях посредством механизмов, отличных от большинства традиционных антибиотиков [6]. Однако до настоящего времени в литературе нет сведений о влиянии АМП грибного происхождения на бактерии, образующие биопленки. Выделение и описание нового алкалофильного таксона грибов *Emericellopsis alkalina* Bilanenko & Georgieva из засоленных почв [11] показало широкие пер-

спективы для поиска новых пептидных антибиотиков. Проведенный скрининг различных изолятов данного вида на способность к синтезу антибиотических веществ, позволил выявить перспективный с биотехнологической точки зрения штамм ВКПМ F-1428, характеризующийся уникальным комплексом пептидов с антимикробной активностью в отношении грибов и бактерий. Приоритетным результатом проведенной работы стало выделение и структурно-функциональная характеристика нового, ранее не описанного, секретируемого антимикробного пептида – эмерициллипсина А, являющегося продуктом нерибосомального синтеза и относящегося к группе пептаиболов [2, 12]. Эмерициллипсин А обладает противогрибковой активностью *in vitro* в отношении клинических изолятов патогенных видов дрожжей и грибов – возбудителей аспергиллеза и кандидоза у больных туберкулезом и СПИД, при этом, согласно проведенным экспериментам, обладает относительно низкой цитотоксичностью по отношению к культуре соматических эукариотических клеток млекопитающих [13, 14].

Цель работы – оценка потенциальной антибактериальной активности эмерициллипсина А в отношении клинических биопленкообразующих бактерий – основных возбудителей госпитальных инфекций, в том числе влияние данного пептида на формирование и разрушение биопленок.

МЕТОДИКА

Культивирование штамма – продуцента. Штамм *Emericellopsis alkalina* ВКПМ F-1428 (Hypocreales, Ascomycota) депонирован в ВКПМ, коллекции “Грибы экстремальных местообитаний” кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и коллекции продуцентов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, как продуцент комплекса антимикробных пептидов. Штамм *E. alkalina* синтезирует комплекс липофильных соединений пептидной природы, преобладающим среди которых является липопептаибол эмерициллипсин А, обладающий антимикробным действием в отношении широкого спектра дрожжевых и мицелиальных грибов, а также грамположительных бактерий [15].

Культивирование штамма для накопления эмерициллипсина А осуществляли в стационарных условиях в течении 14 сут в колбах Эрленмейера на специализированной жидкой щелочной среде, подобранной ранее [2]. В качестве посевного материала использовали 5-суточную культуру гриба, выращенную на агаризованной щелочной среде [2]. Мицелий и споры отделяли от культуральной жидкости центрифугированием.

Выделение эмерициллипсина А. Эмерициллипсин А выделяли из культуральной жидкости по ранее разработанной схеме выделения, описанной в работах [2, 12]. Разделение активных фракций, выделение и очистку пептида проводили последовательно методами экстракции, прямо-фазной и гидрофобной хроматографии, как описано ранее. Для выделения индивидуального компонента использовали аналитическую обращено-фазовую ВЭЖХ. Обогащенный концентрат, полученный после растворения упаренного этилацетатного концентрата культуральной жидкости, наносили на колонку XBridge ВЕН 4.6 × 250 мм ("Waters", Ирландия) с неподвижной фазой С18 и осуществляли фракционирование в градиенте повышения концентрации ацетонитрила в воде с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты: 16–28% – за 12 мин; 28–55% – за 27 мин; 55–75% – за 20 мин и 75–85% – за 10 мин, с последующим изократическим элюированием в течение 25 мин. Детектирование поглощения разделяемых веществ осуществляли при трех длинах волн (214, 247 и 280 нм). Эмерициллипсин А детектировали по поглощению при длине волны 214 нм и времени удержания согласно протоколу, описанному в работе [12].

Тест-микроорганизмы. Клинические изоляты бактерий *Staphylococcus aureus* (4 изолята), *Enterococcus faecalis* (4 изолята), *E. faecium* (1 изолят), *Acinetobacter baumannii* (2 изолята), *Klebsiella pneumoniae* (1 изолят), выделенные из клинического материала различных пациентов, были взяты из коллекции культур лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ЦНИИ эпидемиологии (Москва, Россия). Стафилококки характеризовались чувствительностью к аминогликозидам, фторхинолонам, гликопептидам и β-лактамам, за исключением пенициллинов; энтерококки – к ампициллину, ванкомицину, линезолиду, нитрофурантоину (за исключением резистентности *E. faecium* к ампициллину); *K. pneumoniae* – к цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, фторхинолонам. Изоляты *A. baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью сохраняли чувствительность только к колистину. Тест-культуры клинических изолятов *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* и *Candida albicans*, выделенные из биологических жидкостей особей крупного рогатого скота, были взяты из коллекции кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета.

Формирование *in vitro* биопленок. Тестируемые бактерии выращивали на плотной питательной среде 18 ч при температуре 37°C. Из выросших культур готовили бактериальную суспензию плотностью 0.5 мкФ в бульоне Мюллер-Хинтона, которую затем разбавляли до концентрации 10⁵ КОЕ/мл. Приготовленный инокулят тестируемых бакте-

рий добавляли по 150 мкл в лунки 96-луночного планшета, в которые помещали стерильные тефлоновые кубики размером 4 × 4 мм для формирования на их поверхности биопленок. Инкубировали в течение 20 ч на орбитальном шейкере при скорости вращения 110 об./мин и температуре 35°C [15, 16].

Антимикробная активность, ассоциированная с разрушением сформированных биопленок (анти-биопленочная активность). Кубики, содержащие биопленки, переносили в лунки 96-луночного микротитровального планшета с 200 мкл серийных двукратных разведений АМП и инкубировали в течение 18 ч при 37°C. Для определения минимальной биоцидной концентрации пептида (МБК) в отношении дисперсных клеток биопленки оценивали самую низкую его концентрацию, которая обеспечивала выживаемость субкультуры <0.1%. С этой целью отбирали аликвоты по 10 мкл из лунок без видимого роста, проводили посев на плотные питательные среды и инкубировали в течение 20 ч при 37°C. Тефлоновые кубики промывали для удаления неприкрепленных бактериальных клеток, а затем механически разрушали биопленки на поверхности кубиков. Для определения минимальной биоцидной концентрации АМП, уничтожающей биопленку (МБК_б), разрушенные биопленки рекультивировали в бульоне Мюллера-Хинтона и определяли возобновление роста бактерий [16].

Антимикробная активность *in vitro*, ассоциированная с подавлением формирования биопленок. Изоляты бактерий инкубировали при 37°C, 24 ч в присутствии различных концентраций эмерициллипсина А в 96-луночных планшетах, в лунки которого помещали тефлоновые кубики. Каждая лунка планшета с кубиком содержала 200 мкл инокулята плотностью 10⁵ КОЕ/мл. После инкубации отработанную среду аспирировали, а кубики промывали раствором для удаления неприкрепленных бактерий и высушивали на воздухе. Образование связанной с поверхностью кубиков биопленки анализировали путем их окрашивания 0.1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 5 мин и дальнейшим экстрагированием кристаллического фиолетового этанолом. Затем измеряли оптическую плотность полученных растворов при 595 нм (ОП₅₉₅). При обработке результатов оптическая плотность, полученная в результате окрашивания кубиков без биопленки, не учитывалась [16, 17].

Статистический анализ. Результаты анализа ингибирования образования биопленки представлены в виде средних значений ± стандартные отклонения. Для сравнения различий между контрольными и обработанными антимикробными биопленками использовался однофакторный дисперсионный анализ с помощью множественного

сравнительного теста Бонферрони. Значение $p < 0.005$ считалось статистически значимым [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антибактериальная активность эмерициллипсина А. Как было отмечено ранее [12] эмерициллипсин А представляет собой пептидный антибиотик, обладающий разнонаправленным спектром антимикробного действия. Фунгицидная активность выражается в неспецифическом действии на эукариотические патогенные дрожжевые и мицелиальные виды грибов, обладающие высоким уровнем резистентности к традиционным противогрибковым препаратам группы азолов и макроциклов с клеточной мембраной. Антибактериальный эффект антибиотика менее выражен, чем антифунгальный, и имеет явно выраженную специфичность. Стоит отметить, что ингибирующее действие данного вещества направлено преимущественно на грамположительные бактерии: так, активность по отношению к *S. aureus* и *B. cereus* (4 и 16 мкг/мл соответственно) сопоставима с эффектом, достигаемым при применении ванкомицина (3 и 12 мкг/мл, соответственно) [12], тогда как клинические изоляты *E. faecalis* подавлялись на уровне МБК лишь при 40 мкг/мл. Характерно, что антимикробная активность эмерициллипсина А против грамотрицательных форм была гораздо менее выражена и МБК превышала 300 мкг/мл. По отношению к таким бактериям характер действия изучаемого пептидного токсина можно классифицировать как бактериостатический, не ассоциированный непосредственно с взаимодействием с клеточной оболочкой.

Влияние эмерициллипсина А на разрушение биопленок, сформированных бактериями. С целью исследования возможного механизма антибактериального действия эмерициллипсина А была проверена его активность в отношении планктонных и прикрепленных клеток у культур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и образований ими биопленок (табл. 1).

Планктонные клетки тестируемых клинических бактерий показали различную чувствительность к пептиду, значения составили МБК от 12.5 до 50.0 мкг/мл, что в отдельных случаях не превышало концентрации клинически эффективных антибиотиков, за пределами которых определяется устойчивость бактерий, и рекомендованных EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing): амикацина ($R > 16$ мкг/мл), фосфомицина ($R > 32$ мкг/мл) в отношении стафилококков; нитрофурантоина ($R > 64$ мкг/мл) в отношении *E. faecalis*.

Антибиопленочная активность пептида находилась в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл для грамположительных бактерий (*S. aureus*, *E. faecium*,

Таблица 1. Значение МБК (для планктонных (МБКп) и прикрепленных (МБКпр) клеток) и МБКб эмерициллипсина А в отношении клинических изолятов бактерий

Изоляты бактерий	МБКп	МБКпр	МБКб
	мкг/мл		
<i>S. aureus</i> 1	12.5	25	100.0
<i>S. aureus</i> 2	12.5	25	50.0
<i>S. aureus</i> 3	25.0	100	100.0
<i>S. aureus</i> 4	12.5	25	100.0
<i>E. faecium</i> 5	25.0	100	200.0
<i>E. faecalis</i> 6	50.0	100	200.0
<i>E. faecalis</i> 7	50.0	100	200.0
<i>E. faecalis</i> 8	25.0	100	200.0
<i>E. faecalis</i> 9	25.0	100	200.0
<i>A. baumannii</i> 10	50.0	>200	>200.0
<i>A. baumannii</i> 11	25.0	200	>200.0
<i>K. pneumoniae</i> 12	25.0	200	>200.0

E. faecalis) и превышала 200 мкг/мл – для грамотрицательных (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*), что свидетельствовало о слабом действии эмерициллипсина А на предварительно сформированные биопленки клинических грамотрицательных бактерий. Наблюдаемое повышение устойчивости бактериальных биопленок к эмерициллипсину А, по сравнению с планктонными культурами, согласуется со многими данными по резистентности биопленок к любым антимикробным агентам [15, 16]. Исследуемый антибиотик не обладал способностью к активному взаимодействию с экзополисахаридным матриксом, составляющим основу бактериальных биопленок, что, по-видимому, определяется, в первую очередь, отсутствием функциональных групп на его поверхности.

Влияние эмерициллипсина А на формирование биопленок клиническими изолятами бактерий. Установлено, что эмерициллипсин А ингибировал образование биопленок клиническими изолятами *S. aureus* (рис. 1). Максимальный эффект наблюдался при концентрациях пептида, соответствующих 1/2 МБК и составил от 73.2 до 97.8%, в зависимости от изолята. При концентрации 1.5 мкг/мл образование биопленки достоверно уменьшилось на 53.0, 56.0, 53.1% соответственно *S. aureus* 1, 2, 3. В отношении *E. faecalis* 6, 7, 8, 9 ингибирующий эффект наблюдался при 1/2 МБК и составил 87.6, 94.8, 69.3, 98.2% соответственно (рис. 2). Концентрации пептида в 8 раз ниже МБК способствовали уменьшению образования биопленки *E. faecalis* 6, 7, 8, 9 на 56.8, 68.0, 30.0, 51.4% соответственно. Для клиниче-

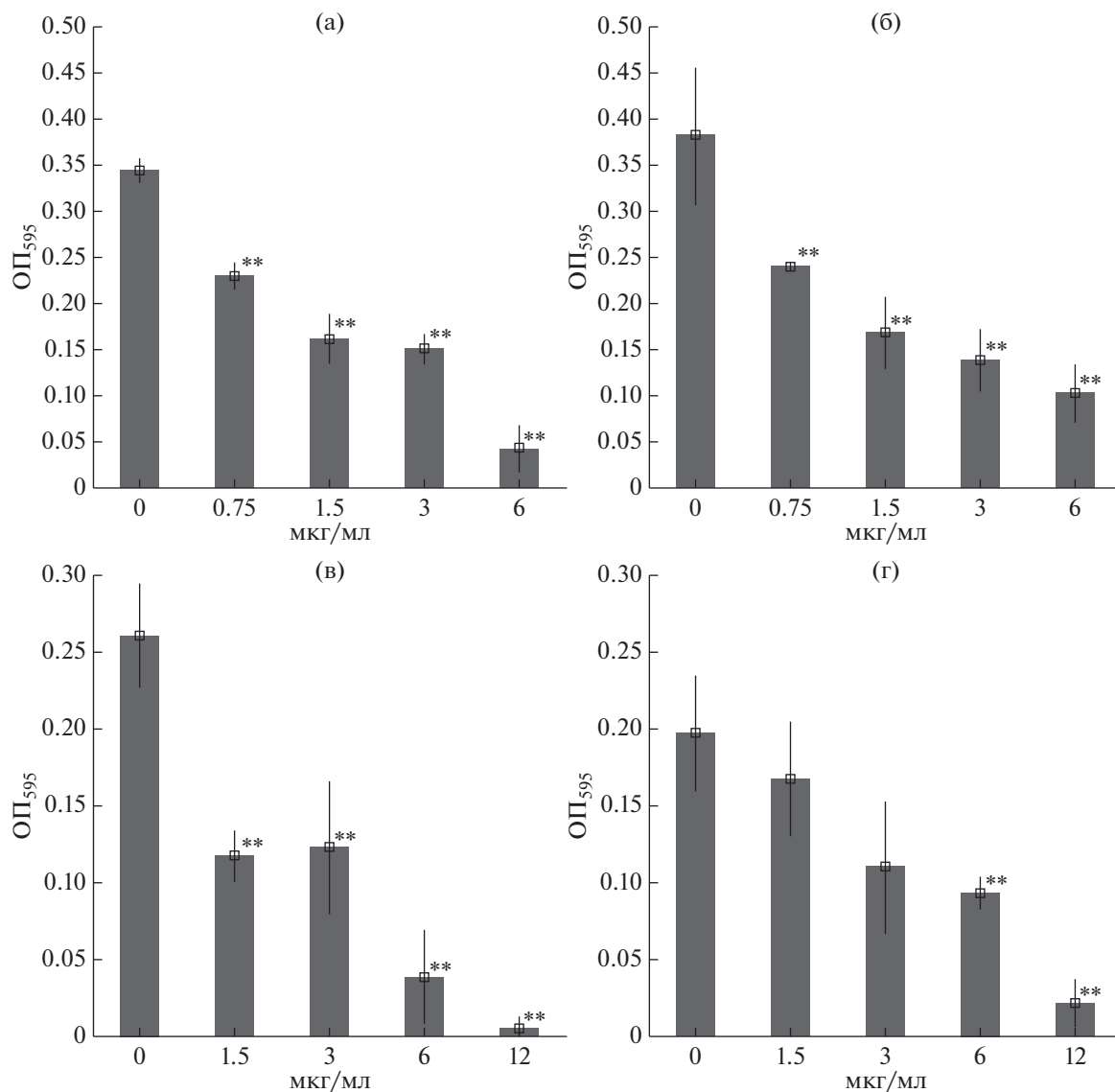


Рис. 1. Анализ образования биопленки (OP₅₉₅) штаммами *S. aureus* при различных концентрациях эмерицеллипсина А (мкг/мл): а – *S. aureus* 1; б – *S. aureus* 2; в – *S. aureus* 3; г – *S. aureus* 4. ** Концентрации пептида, при которых наблюдались статистически значимые различия между контрольными биопленками и биопленками, образующимися в присутствии пептида ($p < 0.005$).

ского изолята *E. faecium* и грамотрицательных бактерий *A. baumannii* 11, *K. pneumoniae* 12 достоверное ингибирование образования биопленок наблюдалось только при 1/2 МБК и составило 39.0, 53.2, 57.1% соответственно.

Таким образом, субингибирующие концентрации эмерицеллипсина А предотвращали образование бактериальных биопленок *in vitro* в отношении грамположительных бактерий наиболее эффективно, чем в отношении грамотрицательных, при этом наблюдалось достоверное различие как между клиническими изолятами одного вида бактерий, так и между изолятами различной видовой принадлежности.

В работе впервые показано влияние анти-микробных метаболитов грибов из группы пептабиолов на способность к ингибированию патогенных форм бактерий через воздействие на образование биопленок, что является одним из ключевых факторов антибиотикорезистентности. При этом, как было отмечено ранее, наиболее выраженный эффект был продемонстрирован в отношении грамположительных форм, что определяет специфичность антибактериального действия данного пептида. Полученные результаты расширяют понимание механизмов анти-микробной активности секретируемых мицелиальными грибами метаболитов и их селективное

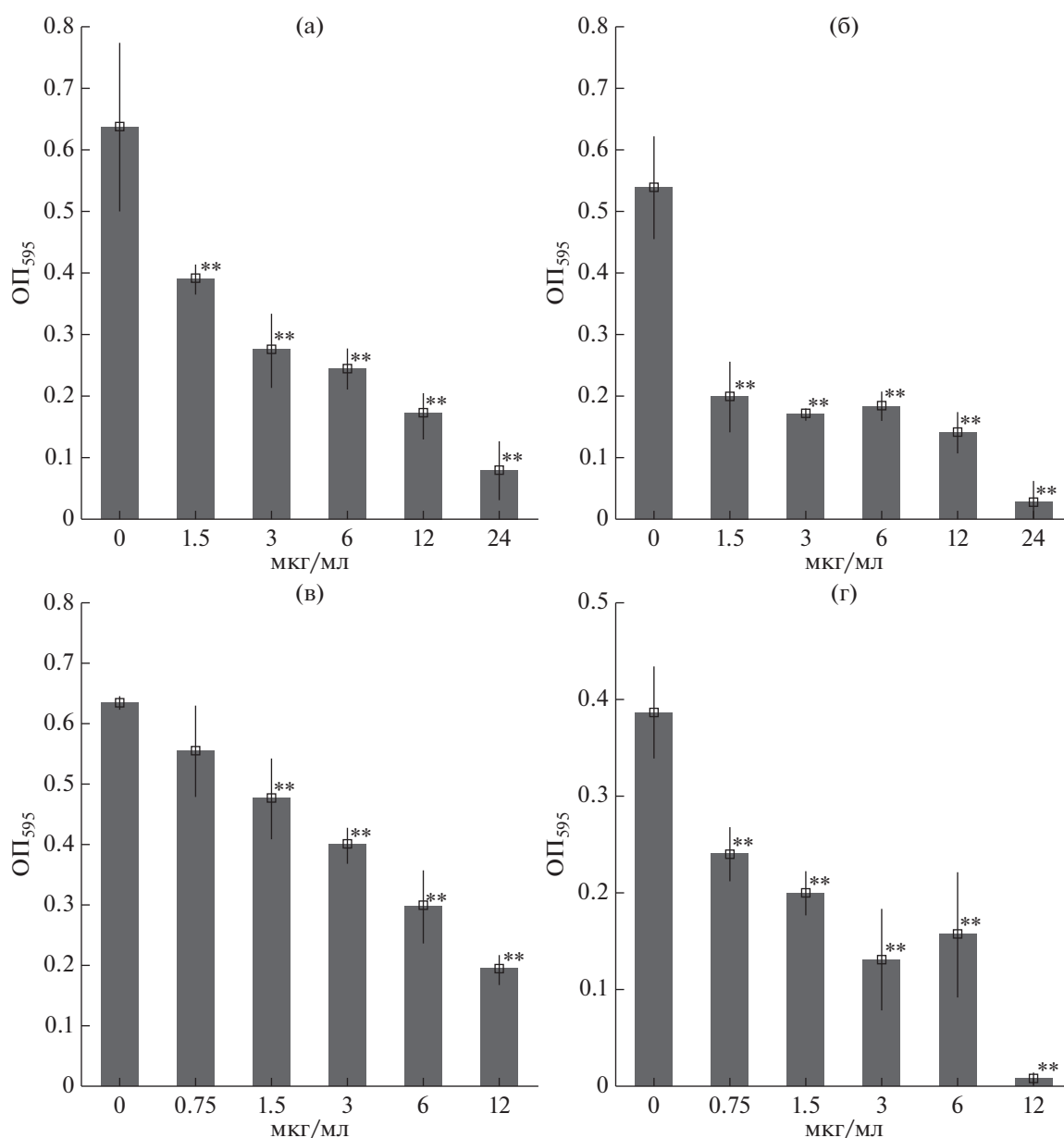


Рис. 2. Анализ образования биопленки (OP₅₉₅) штаммами *E. faecalis* при различных концентрациях эмерициллипсина А (мкг/мл): а – *E. faecalis* 6; б – *E. faecalis* 7; в – *E. faecalis* 8; г – *E. faecalis* 9. ** Концентрации пептида, при которых наблюдались статистически значимые различия между контрольными биопленками и биопленками, образующимися в присутствии пептида ($p < 0.005$).

воздействие на сопутствующую микробиоту при конкурентных взаимоотношениях в сообществах.

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета и лично Сычевой М.В. за помощь в исследовании антимикробных свойств эмерициллипсина А.

Работа по выделению и накоплению эмерициллипсина А для биологических испытаний выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10073), работа

по культивированию продуцента при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90088.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yazici A., Ortucu S., Taskin M., Marinelli L. // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2018. V. 18. № 24. P. 1–6.
2. Do T., Devine D., Marsh P.D. // Clin. Cosmet. Investig. Dent. 2013. V. 5. № 6 P. 11–19.

3. Baranova A.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Andreev Y.A., Rogozhin E.A., Sadykova V.S. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 6. P. 703–710.
4. Athina A., Molchanova N., Jenssen H. // Biomolecules. 2018. V. 8. № 2. № 27. P. 1–29.
5. Costerton W., Veeh R., Shirliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. // J. Clin. Investig. 2003. V. 112. № 10. P. 1466–1477.
6. Fan L., Sun J., Zhou M., Zhou J., Lao X., Zheng H., Xu H. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 24482.
7. Jacobsen A.S., Jenssen H. // Future Med. Chem. 2012. № 4. P. 1587–1599.
8. Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E.C.W., Rehm B.H.A., Hancock R.E.W. // Infect. Immun. 2008. V. 76. № 9. P. 4176–4182.
9. Журлов О.С. // Успехи современного естествознания. 2015. № 9 Т. 1. С. 107–109.
10. Mansour S.C., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E.W. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. P. 323–329.
11. Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. // IMA Fungus. 2013. V. 4. № 2. P. 213–228.
12. Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Baranova A.A., Vasilchenko A.S., Lushpa V.A., Mineev K.S., Georgieva M.L., Kul'ko A.B., Krashennnikov M.E., Lyundup A.V., Vasilchenko A.V., Andreev Y.A. // Molecules. 2018. V. 23. № 11. № 2785.
13. Rogozhin E., Sadykova V.A. // Proceedings. 2019. V. 22. E. 4. P. 1–12.
14. Baranova A.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Kul'ko A.B., Yakushev A.V., Alferova V.A., Sadykova V.S. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. V. 55. № 2. P. 145–151.
15. Садыкова В.С., Рогожин Е.А., Баранова А.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н., Васильченко А.С. Патент РФ № 2704421, 2019.
16. Plakunov V.K., Martyanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. // Microbiology. 2016. V. 85. № 4. P. 509–513.
17. MBEC™ Assay For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms Procedural manual. Version 1.1 For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. Date of Issue: 17 November 2015. ©Innovotech, Inc.
18. O'Toole G.A. // J. Visualized Experiments. 2011. V. 47. P. e2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
19. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с.
20. Pfalzgraff A., Brandenburg K., Weindl G. // Front Pharmacol. 2018. V. 28. № 9. P. 281. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>
21. Khan F., Nguyen P.D.T., Oloketuyi S.F., Kim Y.M. // Curr. Pharm. Biotechnol. 2019. V. 30 P. 345–360. <https://doi.org/10.2174/1389201020666191112155905>

Antimicrobial Activity of Lipopeptide – Emericellipsin A, Isolated from *Emericellopsis alkalina*, Against Biofilm-Forming Pathogenic Clinical Bacteria

V. S. Sadykova^{a, b, *}, I. A. Gavryushina^{a, b}, A. E. Kuvarina^{a, b}, N. N. Markelova^{c, d},
N. G. Sedykh^d, M. L. Georgieva^{a, e}, A. C. Barashkova^b, and E. A. Rogozhin^{a, b, f}

^aGause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

^bInstitute of Bioorganic Chemistry named after Academicians M.M. Shemyakina and Yu.A. Ovchinnikova, Moscow, 117997 Russia

^cFSBI “Russian Scientific Center of X-ray Radiology” of the Ministry of Health of Russia, Moscow, 117997 Russia

^dFBIN Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, 111123 Russia

^eMoscow State University, Moscow, 119234 Russia

^fTyumen State University, Tyumen, 625003 Russia

*e-mail: sadykova_09@mail.ru

The antimicrobial activity of the new nonribosomal peptide emericellipsin A against biofilm-forming pathogenic gram-positive and gram-negative clinical bacteria was studied. For the first time, the effect of peptides from the group of peptaibols on the ability to inhibit pathogenic forms of bacteria through the effect on biofilm formation is shown. The most pronounced effect was demonstrated in relation to gram-positive bacteria.

Keywords: biofilm-forming bacteria, antimicrobial peptides, emericellipsin A, alkalophilic fungi, *Emericellopsis alkalina*, inhibition of formation biofilm

УДК 579.242;579.222.2

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НОВЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ФЕНОЛА

© 2020 г. В. Н. Поливцева¹, Т. О. Анохина¹, Л. Р. Иминова²,
О. В. Борзова², Т. З. Есикова¹, И. П. Соляникова^{1, 2, *}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Федеральный исследовательский центр
“Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: innas@IBPM.Pushchino.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 13.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Из чистых почв и почв, загрязненных полициклическими ароматическими углеводородами, выделены бактерии, в том числе ризосферные, способные в различной степени трансформировать алифатические и ароматические соединения. Отобрано 7 бактерий, способных разлагать фенол в концентрации не менее 500 мг/л. Идентификация по гену 16S рРНК показала, что они относятся к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus* и *Isoptericola*. Определение активности ферментов деструкции фенола у всех этих культур показало отсутствие *meta*-пути расщепления пирокатехина при деградации фенола. В бесклеточных экстрактах обнаружены активности пирокатехин-1,2-диоксигеназы и протокатехоат-3,4-диоксигеназы, активность последнего фермента была до 15 раз выше, чем пирокатехин-1,2-диоксигеназы, что для представителей рода *Isoptericola* описано впервые. Штаммы, выделенные из ризосферы растений, растущих на загрязненной почве, были способны к деструкции до 15 индивидуальных поллютантов, таких как алифатические углеводороды, хлорфенолы, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота и капролактан. С применением биохимических тест-систем для представителей родов *Stenotrophomonas* и *Isoptericola* было показано наличие активности таких ферментов как β -галактозидаза и лизин-декарбоксилаза. Выделенные бактерии могут быть использованы как для создания препаратов для биомередиации, так и штаммов-продуцентов целевых ферментов.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus* и *Isoptericola*, фенол, деструкция, поллютанты

DOI: 10.31857/S0555109920030095

Ароматические соединения и их производные широко распространены в природе и приводят к значительному загрязнению окружающей среды. Фенол — это один из широко распространённых промышленных загрязнителей, его источниками являются нефтехимические предприятия. Часть фенола поступает в окружающую среду в результате разложения растительных и животных остатков. Фенол и особенно его производные (крезолы, ксиленолы, нафтолы гидрохинон, резорцин, пирогаллол, нитро- и хлорфенолы и др.), используемые в различных отраслях производства, токсичны для животных, человека, микроорганизмов, поэтому промышленные сточные воды с высоким содержанием фенола плохо поддаются биологической очистке. Фенол и его производные как естественного, так и антропогенного происхождения, классифицированы Агентством по токсическим субстанциям и регистрации заболеваний (ATSDR),

как приоритетные опасные вещества в силу их потенциального токсического, мутагенного, канцерогенного и тератогенного эффектов.

Биологические способы очистки, в частности микробная биodeградация, имеют огромный потенциал и конкурентные преимущества, связанные прежде всего с их экологической безопасностью и более низкой стоимостью [1]. Многие бактерии способны к деструкции фенола, среди них грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, и представители грамположительных бактерий родов *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Bacillus* [2–6]. Микроорганизмы разлагают токсичные ароматические соединения до безопасных для живых организмов и легко утилизируемых субстратов, поэтому выделение и характеристика новых штаммов-деструкторов является перспективным направлением исследова-

ний для создания эффективных биопрепаратов, пригодных для биоремедиации.

Цель работы — характеристика новых почвенных микроорганизмов, способных к деградации ароматических соединений, выделенных из различных источников: загрязненных и незагрязненных почв России и Казахстана.

МЕТОДИКА

Организмы, методы культивирования. Микроорганизмы были выделены из почвы, отобранной в окрестностях г. Пушкино Московской обл. (Россия), из ризосферной незагрязненной и загрязненной почвы г. Саратова (Саратовский нефтеперерабатывающий завод, Россия) и Казахстана. Отбор проб проводили с глубины 5–10 см. Для выделения микроорганизмов использовали почву после перемешивания отобранных образцов. Образцы почвы (5 г) вносили в колбы Эрленмейера со 100 мл минеральной среды следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 — 0.7; KH_2PO_4 — 0.5; NH_4NO_3 — 0.75; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2; MnSO_4 — 0.001; FeSO_4 — 0.02, NaHCO_3 — 0.25, содержащей 100 мг/л бензоата. Культивирование образцов проводили на качалке (180 об./мин) при 28°C в течение 7 сут. Клетки высевали на агаризованную богатую среду Luria Bertani (LB) после разведения до 10^{-6} – 10^{-8} . Отдельные колонии, отличающиеся по морфотипу, высевали на богатую среду для дальнейшей работы.

Для получения биомассы штаммы культивировали на минеральной среде. Культуры засевали в колбы объемом 750 мл, содержащие по 200 мл минеральной среды с 0.2 г/л фенола в качестве единственного источника углерода и энергии. Бактерии выращивали на качалке при 220 об/мин при температуре 28°C до оптической плотности (ОП) 0.7–0.8 ед., далее повторно вносили 0.2 г/л фенола по мере его потребления культурой. Рост культуры оценивали спектрофотометрически по ОП при длине волны 590 нм, присутствие фенола определяли по спектру поглощения в области 220–350 нм на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония).

Идентификацию бактерий. Определение штаммов проводили на основе анализа генов 16S рРНК. Геномную ДНК выделяли с помощью набора Zymo Reseach Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (“Zymo Reseach”, США) в соответствии с рекомендацией производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали в ПЦР, используя универсальные для 16S рРНК прокариот праймеры: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') [7]. ПЦР осуществляли на приборах My-Cycler, Tetrad 2 (“BioRad Laboratories”, США).

Филогенетический анализ. Первичный филогенетический скрининг полученных последовательностей проводили с помощью программы BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>] и базы данных EzBioCloud (www.ezbiocloud.net). Для филогенетического анализа были использованы последовательности гена 16S рРНК, взятые из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК выравняли вручную с последовательностями референтных штаммов ближайших микроорганизмов с помощью программы CLUSTAL W [8].

Проверка деградативной активности бактерий по отношению к фенолу. Штаммы культивировали в минеральной среде с фенолом (начальная концентрация 100 мг/л) в качестве источника углерода и энергии. За ростом культур следили, определяя ОП при 590 нм, присутствие фенола контролировали, снимая спектры в диапазоне 220–350 нм. рН среды поддерживали в диапазоне значений 7.0–7.2 путем внесения NaOH. Культуры, утилизирующие фенол в концентрации 100 мг/л, пересевали в свежую минеральную среду, концентрацию фенола увеличивали до 300 мг/л. Культуры, способные расти в минеральной среде с фенолом при его концентрации 300 мг/л, пересевали в свежую среду с фенолом с концентрацией 500 мг/л.

Определение способности бактерий утилизировать различные поллютанты. Отобранные культуры бактерий проверяли на способность утилизировать различные ароматические, алифатические и хлорсодержащие соединения, которые добавляли в минеральную среду в качестве единственного источника углерода и энергии. Субстраты использовали в следующих концентрациях: фенантрен, антрацен, флюорен, аценафтен, фенол, капролактан — 0.2–1.0 г/л; салицилат, гентизат, протокатехоат, *o*-фталат, 2-гидроксикоричная кислота, пирокатехин, фенол, бензоат, хлорбензоаты (2-, 3-, 4-хлорбензоат, 3,5-дихлорбензоат), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота — 0.2 г/л; хлорфенолы (2-, 3-хлорфенол, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-дихлорфенол, 2,3,4-, 2,4,5-, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол) — 0.1 г/л. При выращивании штаммов на агаризованной среде летучие ароматические и алифатические соединения: нафталин, бензол, толуол, этилбензол, гексан, октан, нонан, декан, ундекан, додекан, гексадекан, дизельное топливо, камфора, кумарин наносили на крышку перевернутой чашки Петри.

Микроскопические методы исследования. Микроскопические исследования штаммов проводили с использованием микроскопов Nikon Eclipse Ci microscope (“Nikon”, Япония) с камерой ProRes SpeedXT (“Jenoptic”, Германия).

Определение спектра утилизируемых субстратов бактериальных изолятов. Использовали тесты

API 20 E и CH 50 (“bioMérieux”, Франция), согласно инструкциям производителя.

Приготовление бесклеточных экстрактов. Клетки разрушали экструзионной дезинтеграцией на прессе типа Хьюза (“ИБФМ-пресс”, Россия) с рабочим давлением 3200 кГ/см². После дезинтеграции клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 10000 g (4°C, 30 мин) в присутствии следовых количеств ДНК-азы. Супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов. В 1.0 мл реакционной смеси вносили 5–50 мкл экстракта. Определение активностей проводили при 25°C, реакцию начинали внесением бесклеточного экстракта, ОП определяли на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония).

Определение активности ферментов. Активность пирокатехин-2,3-диоксигеназы определяли по скорости образования 2-гидроксимуконного полуальдегида в реакционной смеси, содержащей 0.25 мМ пирокатехин, бесклеточный экстракт и 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 7.5) ($\lambda = 375$ нм, $\epsilon = 33400$ М⁻¹ см⁻¹) [9].

Активность пирокатехин-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования *цис,цис*-муконата в реакционной смеси, содержащей 5.0 мМ Na ЭДТА, 0.25 мМ пирокатехин, бесклеточный экстракт, 50 мМ фосфатный буфер (pH 7.0) ($\lambda = 260$ нм, $\epsilon = 16900$ М⁻¹ см⁻¹) [9].

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования малеилпирувата в реакционной смеси, содержащей 0.1 мМ гентизата, бесклеточный экстракт и 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.4) ($\lambda = 330$ нм, $\epsilon = 10800$ М⁻¹ см⁻¹) [10].

Активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы определяли по убыли протокатехоата в реакционной смеси, содержащей 0.25 мМ протокатехоата, бесклеточный экстракт в трис-ацетатном буфере (pH 7.5) ($\lambda = 290$ нм, $\epsilon = 2870$ М⁻¹ см⁻¹) [11].

За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата или образование 1 мкмоль продукта за 1 мин в расчете на 1 мг клеточного белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Бредфорда [12].

Статистическая обработка. Средние значения и стандартные ошибки среднего арифметического были получены по данным из трех независимых экспериментов с использованием программы Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение штаммов. С применением метода накопительного культивирования из образцов различных почв была создана коллекция штам-

мов-деструкторов ароматических соединений. На первом этапе были выделены штаммы, способные расти в минеральной среде с бензоатом, так как это соединение менее токсично, по сравнению с фенолом, а полная деструкция и бензоата и фенола предполагает образование на первом этапе пирокатехина, дальнейшую трансформацию которого осуществляют изофункциональные ферменты [13]. Таким способом было отобрано порядка 80 штаммов. В дальнейшем отобранные штаммы исследовали на способность утилизировать фенол в качестве единственного источника углерода при его содержании в среде от 100 до 500 мг/л. Выделенные из различных загрязненных и незагрязненных почв штаммы, были разделены на 3 группы.

Первая группа состояла из 8 штаммов, выделенных из ризосферы растений, растущих в незагрязненной почве, эти штаммы были обозначены – Fch 1–8. Они разлагали фенол в концентрации 100 мг/л. Все штаммы этой группы были пересеяны на минеральную среду с увеличенной до 300 мг/л концентрацией фенола. Штаммы (Fch №№ 4–8), способные разлагать фенол в концентрации 300 мг/л, были пересеяны на минеральную среду, содержащую фенол в концентрации 500 мг/л. Из них наиболее активными оказались 3 штамма – Fch 5, 7, 8.

Из штаммов, выделенных из ризосферы растений, растущих в загрязненной почве, по такому же алгоритму из 6 штаммов (штаммы Fg 1, 3–7), был отобран один штамм Fg 1, способный разлагать фенол в концентрации 500 мг/л.

В третью группу микроорганизмов входило 17 штаммов, выделенных из загрязненной почвы (г. Саратов, “Саратовский нефтеперерабатывающий завод”, Россия). Из этой группы в жидкой среде, содержащей 500 мг/л фенола, росли 3 штамма (8BN, 7B, 13BN).

Таким образом, из 81 выделенного штамма было отобрано 7, способных разлагать фенол в концентрации 500 мг/л (рис. 1).

Систематика. Анализ гена 16S рПНК показал, что отобранные культуры можно отнести к следующим филогенетическим группам: штамм 7B – к роду *Rhodococcus*, штамм 13BN – к роду *Pseudomonas*, штаммы Fch 5, 7 и 8 – к роду *Stenotrophomonas*, штамм Fg 1 к роду *Lysinibacillus* sp. и штамм 8BN к роду *Isoptericola*.

Морфология клеток. Проведенные микроскопические исследования позволили определить характерные морфологические особенности клеток штаммов (рис. 2). Клетки культуры 7B, выделенной из незагрязненной почвы, представлены длинными ветвящимися неподвижными палочками, характерными для родококков. Клетки штамма 13BN представлены средними палочками длиной 2–3 мкм, отличительной особенностью роста куль-

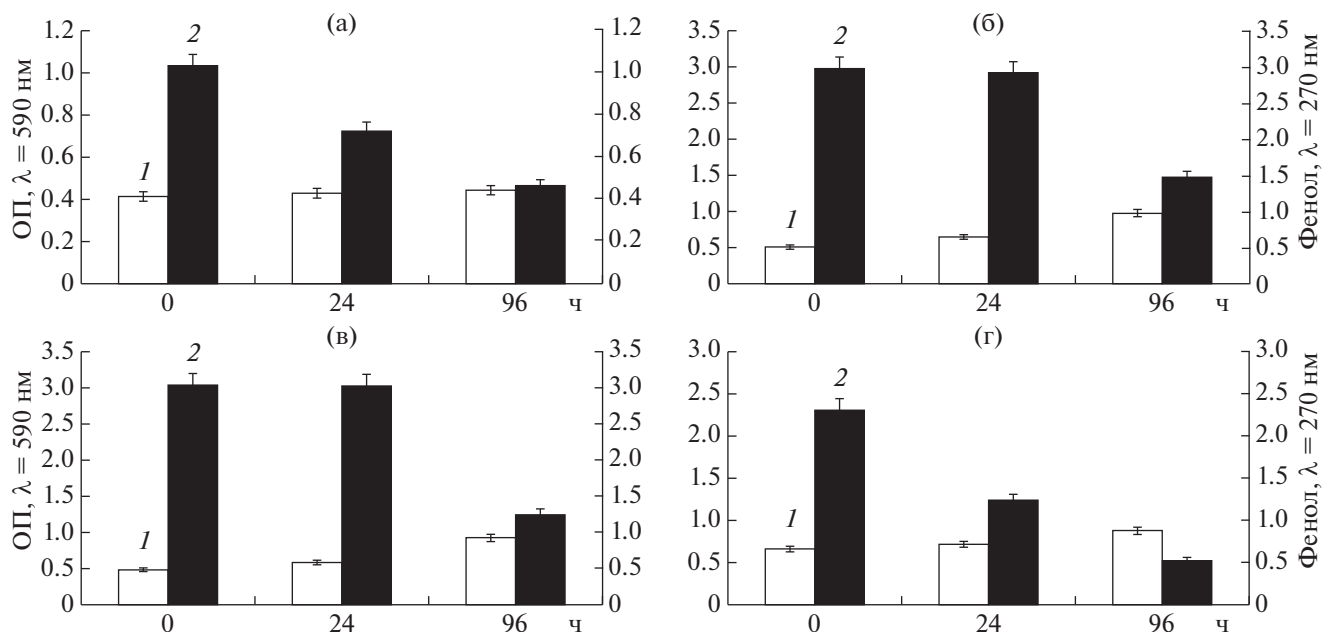


Рис. 1. Изменение ОП клеток (1) и концентрации фенола (2) при выращивании штаммов *Stenotrophomonas* sp. Fch 8 (а), *Pseudomonas* sp. 13BN (б), *Isophtericola* sp. 8BN (в), *Rhodococcus* sp. 7B (г) на минеральной среде с фенолом (концентрация фенола 300 мг/л (а) и 500 мг/л (б–г)).

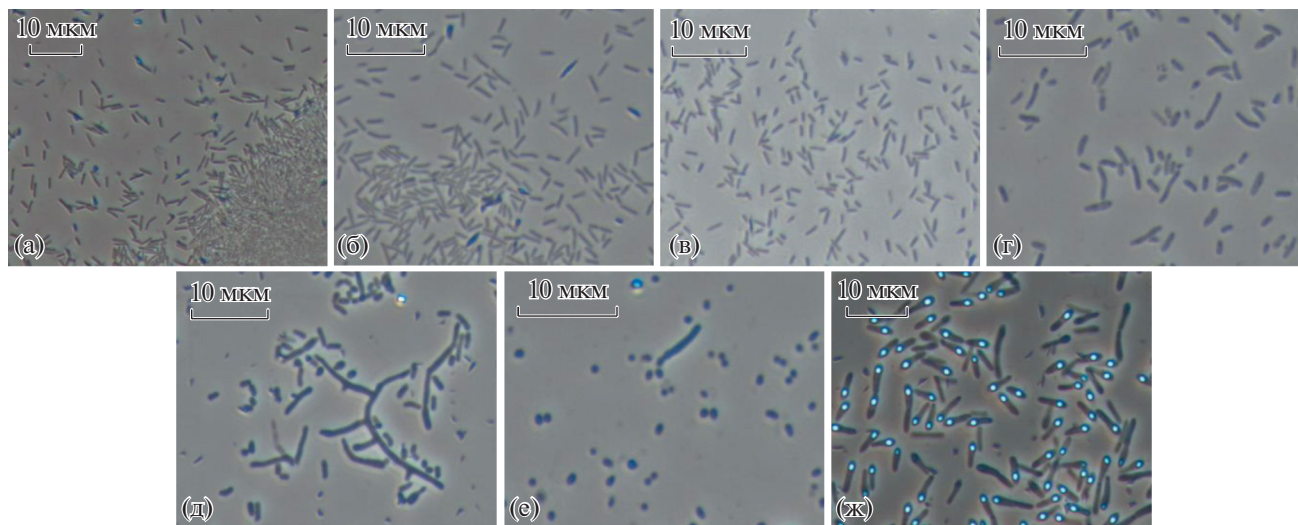


Рис. 2. Фазово-контрастная микроскопия выделенных штаммов: *Stenotrophomonas* sp. Fch 5 (а), *Stenotrophomonas* sp. Fch 7 (б), *Stenotrophomonas* sp. Fch 8 (в), *Pseudomonas* sp. 13BN (г), *Rhodococcus* sp. 7B (д), *Isophtericola* sp. 8BN (е), *Lysinibacillus* sp. Fg 1 (ж).

туры является формирование так называемых “газовых пузырей” на поверхности роста колоний, что было выявлено нами с применением фазово-контрастной микроскопии и требует дальнейшего изучения. Штаммы Fch 5, 7 и 8 – тонкие палочки длиной 1–2 нм, штамм 8BN – мелкие кокки, имеющие в одной из фаз своего развития форму длинных палочек (длиной 3–4 нм), которые способны дробиться с образованием мелких кокков. Клетки Fg 1 – бациллярной формы, обра-

зуют терминально расположенные споры, при этом формируя “булавообразную” форму клетки (рис. 2).

Биохимические свойства. Для определения физиолого-биохимических особенностей культур использовали тесты API 32E и 50CH (“bioMerieux”, Франция). Проведенные исследования отобранных штаммов позволили выявить следующие особенности (табл. 1).

Таблица 1. Биохимические свойства исследуемых штаммов

Показатель*	Штаммы						
	7B	8BN	13BN	Fch 7	Fch 8	Fg 1	Fch 5
Активность фермента							
β-галактозидаза	—	+	—	+	+	—	+
Аргинингидролаза	—	—	+	—	—	—	—
Лизиндекарбоксилаза	—	—	—	—	+	—	+
Уреаза	+	—	—	—	—	—	+
Утилизация цитрата	+	—	+	+	+	—	+
Разжижение желатина	—	—	—	—	+	—	+
Восстановление N ₂	—	—	—	+	+	+	+
Утилизация субстратов**							
L-арабиноза	—	+	+	—	—	—	—
D-ксилоза	—	+	+	—	—	—	—
D-галактоза	—	+	+	—	—	—	—
D-глюкоза	—	+	—	—	—	—	—
D-фруктоза	+	+	—	—	—	—	—
D-манноза	—	+	+	—	+	—	—
Инозит	+	—	—	—	—	—	—
D-маннит	+	—	—	—	—	—	—
D-сорбит	+	—	—	—	—	—	—
Эскулин	+	+	—	+	+	—	+
N-ацетилглюкозамин	—	+	—	—	—	+	—
Амигдалин	—	+	—	—	—	—	—
Арубутин	—	+	—	—	—	—	—
Салицин	—	+	—	—	—	—	—
D-целлобиоза	—	+	—	—	—	—	—
D-мальтоза	—	+	—	+	+	—	+
D-лактоза	—	+	—	—	—	—	—
D-мелибиоза	—	+	—	—	—	—	—
D-сахароза	—	+	—	—	—	—	—
D-трегалоза	—	+	+	—	—	—	—
D-мелецитоза	—	+	—	—	—	—	—
D-раффиноза	—	+	—	—	—	—	—
Амидон (крахмал)	—	+	—	—	—	—	—
Гликоген	—	—	—	—	—	—	—
Гентиобиоза	—	+	—	—	—	—	—
D-тураноза	—	+	—	—	—	—	—
D-тагатоза	—	—	+	—	—	—	—
D-арабит	+	—	—	—	—	—	—

* — отрицательная реакция; + — положительная реакция.

** Все исследованные штаммы показали отрицательную реакцию на образование H₂S и индола, реакцию Фогес-Проскауэра, утилизацию глицерина, эритритола, D-арабинозы, D-рибозы, D-ксилозы, D-адонитола, метил-β D-ксилопиранозида, L-сорбозы, L-рамнозы, дульцитола, метил-α D-маннопиранозида, метил-α D-глюкопиранозида, инулина, ксилита, D-лихисозы, D-фукозы, L-арабита, 2-кетоглюконата, 5-кетоглюконата.

Таблица 2. Рост выделенных штаммов на целевых субстратах

Штамм	Источник выделения	Субстрат для роста
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 5	Ризосфера растений незагрязненных почв	Капролактam, фенол, бензоат, салицилат, гентизиновая кислота, октан, нонан, декан, гексa-декан, додекан, ундекан, 2-хлорфенол, 2,4-дихлорфенол, 2,6-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 7	Ризосфера растений незагрязненных почв	Фенол, 2-хлорфенол
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 8	Ризосфера растений незагрязненных почв	Фенол, пентахлорфенол, 2,5-дихлорфенол
<i>Lysinibacillus</i> sp. Fg 1	Ризосфера растений загрязненных почв	Капролактam, фенол, бензоат, октан, нонан, декан, гексадекан, додекан, ундекан, 2-хлорфенол, 3-хлорфенол, пентахлорфенол, 2,5-дихлорфенол, 2,6-дихлорфенол, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4,6-трихлорфенол, протокатеховая кислота
<i>Pseudomonas</i> sp. 13BN	Загрязненная почва (Саратовский нефтеперерабатывающий завод, Россия)	Фенол, декан, ундекан
<i>Isoptericola</i> sp. 8BN	Загрязненная почва (Саратовский нефтеперерабатывающий завод, Россия)	Фенол
<i>Rhodococcus</i> sp. 7B	Незагрязненная почва	Капролактam, фенол, бензоат, октан, нонан, декан, гексадекан, додекан, ундекан

Практически все исследуемые штаммы утилизировали несколько органических соединений. Исключение составил штамм *Isoptericola* sp. 8BN, который был способен утилизировать многие из исследуемых субстратов, в том числе, N-ацетилглюкозамин — основной компонент клеточной стенки бактерий. Таким же свойством обладал штамм *Lysinibacillus* sp. Fg 1, который рос только на среде с N-ацетилглюкозамином. Этот факт указывает на потенциальную антимикробную активность данных штаммов.

Штаммы рода *Stenotrophomonas* Fch 5, 7, 8 и штамм *Isoptericola* sp. 8BN синтезировали β -галактозидазу, два из них, Fch 5 и 8, проявили также лизин-декарбоксилазную активность, а штамм *Pseudomonas* sp. 13BN активность аргинингидролазы.

Деградaтивный потенциал выделенных культур. Изучение характеристик отобранных штаммов показало, что в большей степени ими утилизировались такие субстраты, как бензоат, фенол, нафталин и *n*-алканы (количество атомов углерода C6—C16) (табл. 2). Более половины из них росли на этих соединениях.

Значительно меньшее количество штаммов могли утилизировать бензол и его производные — толуол и этилбензол, а также хлорсодержащие фенолы и бензоаты. Большинство штаммов не

использовали эти субстраты. Штаммы, обозначенные как Fch 8 и Fg 1, росли на пентахлорфеноле, соединении, которое Стокгольмской конвенцией включено в список стойких органических загрязнителей (СОЗ). С другой стороны, штаммы Fch 5 и Fg 1, выделенные из ризосферы растений, растущих в чистой и загрязненной почве, показали способность к деструкции более чем 15 соединений, в том числе относящихся к СОЗ (штамм Fg 1).

Активности ферментов деградации фенола. В клетках четырех наиболее активно растущих на феноле культур (Fch 8, 13BN, 8BN и 7B) определяли активность ферментов, участвующих в разложении фенола: пирокатехин-1,2-диоксигеназы (ПК-1,2-ДО), пирокатехин-2,3-диоксигеназы (МПК), протокатехоат-3,4-диоксигеназы (ПКК-3,4-ДО), муконатциклоизомеразы (МЦИ) и гентизат-1,2-диоксигеназы (ГДО) (табл. 3).

Обнаружено, что все исследуемые штаммы проявляли активность ПК-1,2-ДО составившую 0.08–0.16 ед./мг белка, в то же время активность ПКК-3,4-ДО в бесклеточных экстрактах штаммов 13BN, 8BN и 7B была выше почти в 15 раз по сравнению с активностью ПК-1,2-ДО. У штамма Fch 8 активность ПКК-3,4-ДО не была обнаружена. Активность МЦИ была также обнаружена только в бесклеточных экстрактах штаммов 13BN,

Таблица 3. Активность (ед./мг белка) ферментов деградации ароматических соединений

Штамм	ПК-1,2-ДО	ПК-2,3-ДО	ПКК-3,4-ДО	МЦИ	ГДО
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Fch 8	0.086 ± 0.009	0.001 ± 0.001	<0.001	0.006 ± 0.002	≤0.001
<i>Pseudomonas</i> sp. 13BN	0.089 ± 0.011	0.002 ± 0.001	1.355 ± 0.121	0.079 ± 0.016	≤0.001
<i>Isoptericola</i> sp. 8BN	0.159 ± 0.028	0.009 ± 0.002	1.098 ± 0.025	0.097 ± 0.049	≤0.001
<i>Rhodococcus</i> sp. 7B	0.122 ± 0.029	<0.001	2.014 ± 0.185	0.046 ± 0.02	≤0.001

8BN и 7B и составляла в среднем 0.07 ед./мг белка. Активности ферментов МПК и ГДО не были обнаружены в бесклеточных экстрактах всех исследуемых штаммов. В клеточных гомогенатах не обнаружены также активности орнитин-декарбоксилазы и триптофандеаминазы.

Из коллекции штаммов-деструкторов бензоата нами было отобрано 7 штаммов, способных утилизировать фенол в концентрации до 500 мг/л. Фенол был выбран для создания коллекции деструкторов, так как он является широко распространенным токсичным соединением, содержание которого в питьевой воде и воздухе должно строго контролироваться [14, 15]. Выделенные нами бактериальные штаммы, способные к деградации фенола в концентрациях выше 500 мг/л, представляют значительный биотехнологический интерес.

Также нами была определена способность отобранных штаммов к утилизации ряда токсичных органических соединений и показано, что два ризосферных штамма Fch 5 и Fg 1 способны расти на более чем 15 субстратах, при этом один из штаммов выделен из незагрязненной почвы (Fch 5). Исследуемые штаммы относятся к различным филогенетическим группам: грамотрицательные — *Stenotrophomonas* sp. Fch 5, Fch 7, Fch 8, *Pseudomonas* 13BN и грамположительные — *Rhodococcus* sp. 7B, *Lysinibacillus* sp. Fg 1 и *Isoptericola* sp. 8BN. Представители последних двух родов мало описаны в литературе как деструкторы токсичных ароматических соединений. Так, в 2018 г. для бактерии *Isoptericola chiayiensis* описана способность к росту на сырой нефти в качестве единственного источника углерода и энергии [16]. Сравнение субстратного профиля описанных ранее и выделенного нами штамма показало их сходство, но в отличие от ранее выделенных штаммов 8BN проявлял β-галактозидазную активность и способность к утилизации N-ацетилглюкозамина [17–19].

Определение активности основных ферментов деградации фенола показало, что исследуемые штаммы проявляли активность ПК-1,2-ДО, при этом у штаммов 13BN, 8BN и 7B в бесклеточном экстракте определена активность ПКК-3,4-ДО, которая была в 15 раз выше, чем активность ПК-1,2-ДО. Одновременное присутствие ПК-1,2-ДО и ПКК-3,4-ДО описано у бактерий разных родов, например, в клетках бактерий *Pseudomonas putida* KT2440, выращенных на бензоате, была обнаружена высокая активность

ПК-1,2-ДО и следы ПКК-3,4-ДО [20], в клетках *Acinetobacter baumannii* DU202, выращенных на пара-Гидроксibenзойной кислоте [21], у некоторых представителей *Amycolatopsis* и *Streptomyces* при утилизации бензоата [22]. У штамма *Rhodococcus* sp. RHA1 ПК-1,2-ДО и ПКК-3,4-ДО обнаруживались одновременно как при росте на бензоате, так и фталате [23], но для представителей рода *Isoptericola* это было описано впервые. Высокая активность фермента ПКК-3,4-ДО может свидетельствовать о том, что процесс деградации фенола идет преимущественно через образование протокатехоата, не характерном для бактерий. Другое возможное объяснение — множественность путей деградации ароматических соединений у бактерий, которые не были адаптированы к росту на целевых субстратах в течение длительного времени.

С применением биохимических тест систем для представителей родов *Stenotrophomonas* и *Isoptericola* качественно было показано наличие активности таких ферментов как бета-галактозидаза и лизин-декарбоксилаза. Эти ферменты получают в промышленности в том числе с помощью микроорганизмов, поэтому исследуемые штаммы могут быть использованы не только для биоремедиации, но и как источник этих ферментов.

Штамм *Lysinibacillus* sp. Fg 1 способен к утилизации N-ацетилглюкозамина — основного компонента бактериальной клеточной стенки. Анализ данных по субстратным профилям описанных ранее в литературе штаммов рода *Lysinibacillus* показал, что эта особенность ранее не была показана и является отличительной характеристикой выделенного штамма [24, 25]. В литературе описаны примеры антимикробной и антигрибной активности штаммов этого рода, в том числе против паразитических грибов растений [26], поэтому дальнейшее его изучение позволит выявить его биотехнологический потенциал. Следует подчеркнуть, что, являясь спорообразующей бактерией, штамм Fg 1 способен к выживанию в неблагоприятных условиях, сохраняясь в виде спор, он может быть транспортирован в сухом виде, поэтому является перспективным при создании биопрепаратов для очистки территорий, удаленных от мест его производства.

Проблема утилизации соединений, относящихся к стойким органическим загрязнителям, является актуальной. К первичному списку,

определенному Стокгольмской конвенцией в 2001 г., постепенно добавляются новые соединения. Штаммы Fch 8 и Fg 1, способные утилизировать пентахлорфенол — соединение, относящегося к СОЗ, являются потенциально значимыми для создания биопрепаратов для очистки территорий, подвергшийся воздействию СОЗ.

В целом можно говорить, что выделенные штаммы являются ценными для применения в различных отраслях биотехнологии и необходимо их дальнейшее изучение, направленное на более глубокую характеристику уже изученных свойств и выявление новых особенностей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00964.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. // J. Environ. Protect. 2011. № 2. P. 47–55.
2. Nešvera J., Rucká L., Pátek M. // Advances in Applied Microbiology. 2015. V. 93. P. 107–160. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.06.002>
3. Geng A., Soh A. E.W., Lim C.J., Loke L.C.T. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. № 5. P. 728–735. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0199-z>
4. Szökö J., Rucká L., Šimčíková M., Halada P., Nešvera J., Pátek M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 19. P. 8267–8279. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5881-5886>
5. Ahmad S., Syed M., Arif N., Shukor M., Shamaan N. // Aust. J. Basic Appl. Sci. 2011. V. 5. № 8. P. 1035–1045.
6. Zhai Z., Wang H. Yan S., Yao J. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2012. V. 87. № 1. P. 105–111.
7. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 2. P. 697–703.
8. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
9. Hegeman G.D. // J. Bacteriol. 1966. V. 91. № 3. P. 1140–1154.
10. Crawford R.L., Hutton S.W., Chapman P.J. // J. Bacteriol. 1975. V. 121. № 3. P. 794–799.
11. Fujisawa H., Hayaishi O. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 10. P. 2673–2681.
12. Schlömann M., Schmidt E., Knackmuss H.-J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 9. P. 5112–5118.
13. Mazzoli R., Pessione E., Giuffrida M.G., Fattori P., Barello C., Giunta C., Lindley N.D. // Arch. Microbiol. 2007. V. 188. № 1. P. 55–68. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0223-z>
14. Liu Y., Wang W., Shah S.B., Zanaroli G., Xu P., Tang H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10271-w>
15. Li H., Meng F., Duan W., Lin Y., Zheng Y. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 184. Article 109658. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109658>
16. Lee D.W., Lee H., Kwon B.O., Khim J.S., Yim U.H., Kim B.S., Kim J.J. // Environ. Pollut. 2018. V. 241. P. 254–264.
17. Bakalidou A., Kämpfer P., Berchtold M., Kuhnigk T., Wenzel M., König H. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. Pt. 4. P. 1185–1192.
18. Stackebrandt E., Schumann P., Cui X.-L. // International J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. Pt. 3. P. 685–688.
19. Kaur N., Rajendran M.K., Kaur G., Shanmugam M. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2014. V. 106. № 2. P. 301–307.
20. Kim Y.H., Cho K., Yun S.-H., Kim J.Y., Kwon K.-H., Yoo J.S., Kim S.I. // Proteomics. 2006. V. 6. № 4. P. 1301–1318.
21. Park S.H., Kim J.W., Yun S.H., Leem S.H., Kahng H.Y., Kim S.I. // J. Microbiol. 2006. V. 44. № 6. P. 632–640.
22. Grund E., Knorr C., Eichenlaub R. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 5. P. 1459–1464.
23. Patrauchan M.A., Florizone C., Dosanjh M., Mohn W.W., Davies J., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 12. P. 4050–4063.
24. Lee C.S., Jung Y.-T., Park S., Oh T.-K., Yoon J.-H. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. Pt. 2. P. 281–286.
25. Begum M.A., Rahul K., Sasikala C., Ramana C.V. // Arch. Microbiol. 2016. V. 198. № 4. P. 325–332. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1194-8>
26. Ahmad V., Iqbal A.N., Haseeb M., Khan M.S. // Anaerobe. 2014. V. 27. № 1. P. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.001>

Evaluation of Biotechnological Potential of New Bacterial Strains Capable for Phenol Degradation

V. N. Polivtseva^a, T. O. Anokhina^a, L. R. Iminova^b, O. V. Borzova^b,
T. Z. Esikova^a, and I. P. Solyanikova^{a, b, *}

^aScriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS “Pushchino scientific center for biological research RAS”, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

^bPushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

*e-mail: innas@IBPM.Pushchino.ru

From clean soils and soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, a number of bacteria, including rhizospheric ones, capable of transforming aliphatic and aromatic compounds to varying degrees were isolated. Seven bacteria capable of decomposing phenol at a concentration of at least 500 mg/L were selected. Identification by the 16S rRNA gene showed that they belong to the genera *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus* and *Isoptericola*. Determination of the activity of phenol destruction enzymes in these

cultures showed the absence of a *meta*-pathway of catechol cleavage during phenol degradation in all studied bacteria. In cell-free extracts the activity of catechol-1,2-dioxygenase and protocatechuate-3,4-dioxygenase was detected, the activity of the latter enzyme was 15 times higher than the catechol-1,2-dioxygenase that for members of the genus *Isoptericola* was described for the first time. Strains isolated from the rhizosphere of plants growing in contaminated soil were capable of destroying up to 15 individual pollutants, such as aliphatic hydrocarbons, chlorophenols, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and caprolactam. With the use of biochemical test systems for representatives of the genera *Stenotrophomonas* and *Isoptericola*, the presence of enzymes such as β -galactosidase and lysine-decarboxylase was shown. The isolated bacteria can be used both to create preparations for bioremediation and to create strains-producers of target enzymes.

Keywords: *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, *Isoptericola*, phenol, degradation, pollutants

УДК 547.689.6;579.66;66.081

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*[−]) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРОГЕСТЕРОНА

© 2020 г. О. С. Савинова^{1, *}, А. М. Чулкин¹, Т. С. Савинова², Е. А. Вавилова¹,
Д. В. Васина¹, П. Н. Сольев³, Т. В. Фёдорова¹

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.11.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Получен штамм *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*[−]) — продуцент рекомбинантной лакказы А базидиомицета *Trametes hirsuta* 072. Проведена биокаталитическая трансформация прогестерона (ПГ) новым штаммом. Основные продукты биотрансформации: 11 α -гидрокси-ПГ, 11 α -ацетокси-ПГ и 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ. Изучена кинетика сорбции ПГ и основных продуктов его биотрансформации из трансформационной среды с использованием сорбента Macronet MN-200. Показана эффективность применения метода твердофазной экстракции стероидов без предварительного отделения мицелия.

Ключевые слова: *Aspergillus nidulans*, лакказы, *Trametes hirsuta*, твердофазная экстракция, Macronet MN-200, прогестерон, 11 α -гидроксипрогестерон, 11 α -ацетоксипрогестерон, 6 β ,11 α -дигидрокси-прогестерон

DOI: 10.31857/S0555109920030113

Стероидные лекарственные препараты занимают одно из важных мест в терапии большого числа заболеваний (воспалительных, аллергических, гинекологических, онкологических и др.) [1, 2]. Работы по поиску методов трансформации природных стероидных соединений с целью получения новых лекарственных препаратов, а также разработки новых экологически чистых технологий, ведутся учеными на протяжении нескольких десятилетий, однако остаются актуальными и в настоящее время. Одним из наиболее важных и перспективных методов является биотрансформация с применением ферментных систем различных микроорганизмов, в том числе мицелиальных грибов [3]. Применение целых клеток микроорганизма в качестве биокатализатора более предпочтительно, так как исключает необходимость выделения, очистки и стабилизации чистых ферментов [4].

Проблема регионаправленного и стереоселективного микробиологического гидроксирования относится к числу важнейших в химии стероидов [3]. В настоящее время для проведения таких трансформаций штаммы выбираются в результате скрининга.

Одним из часто используемых модельных соединений для изучения направленности гидроксирования стероидов ряда прегнана микроорганизмами является прогестерон (ПГ). ПГ — половой гормон, синтезируемый желтым телом яичника, корой надпочечников, семенными пузырьками и плацентой. 11(α / β)-Гидроксирование стероидов, особенно ПГ, является важным процессом при производстве кортикостероидов. Однако введение кислородной функции в C11 положение химическими методами синтеза трудно осуществимо. 11 α -Гидроксипрогестерон (11 α -гидрокси-ПГ), как и его 11 β -эпимер, обладает ингибирующей активностью в отношении фермента 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы, который окисляет 11-гидроксигруппу в 11-кетогруппу, участвуя таким образом в регуляции электролитного баланса [5].

Биотрансформация ПГ с образованием 11 α -гидрокси-ПГ наиболее изучена с применением грибов *Aspergillus ochraceus* [6]. Наличие 11 α -монооксигеназной активности и способности трансформировать ПГ с образованием 11 α -гидрокси-производного обнаружена также у некоторых штаммов вида *Aspergillus nidulans* [7–9]. Несмотря на то, что грибы *A. nidulans* широко применяются в качестве мо-

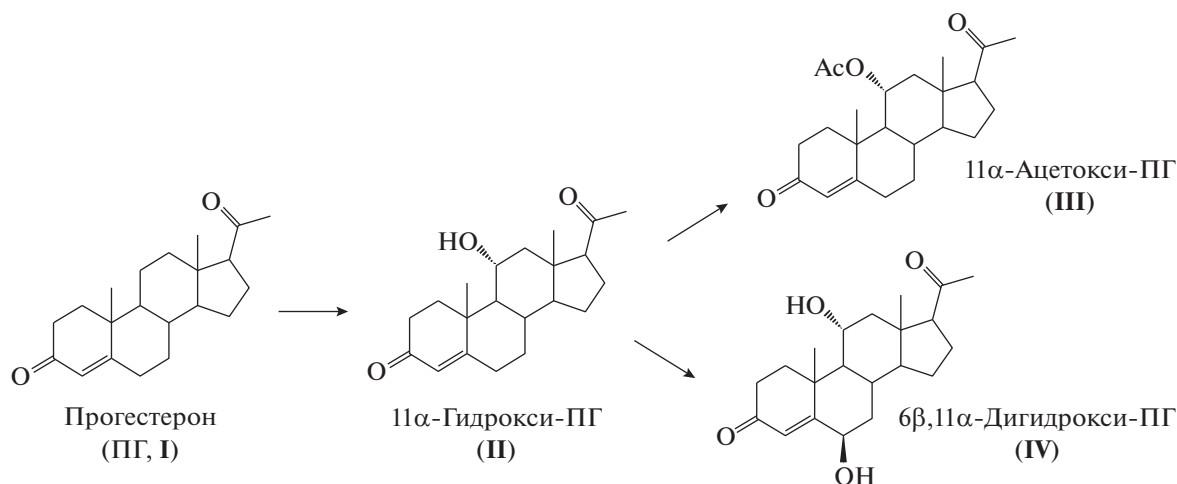


Рис. 1. Схема биотрансформации ПГ штаммом *A. nidulans* ВКПМ F-1069 [10].

дельного организма в молекулярной биологии и биотехнологии, их способность к трансформации стероидов мало изучена.

Ранее было обнаружено, что штамм дикого типа *A. nidulans* ВКПМ F-1069 способен гидроксилировать ПГ с образованием 11α-гидроксипгестерона и 6β,11α-дигидроксипгестерона, а также ацетилировать 11α-гидроксипгестерон (рис. 1) [10].

Известно, что наличие генетических мутаций в штамме может влиять на его стероид-трансформирующую способность (степень превращения исходного субстрата) и региональность гидроксилирования. Так, в работах [11, 12] было показано, что введение плазмиды pUT 720, несущей устойчивость к блеомицину и содержащей ген *Sh ble*, экспрессируемый под контролем сигналов экспрессии *gpd* и *trpC* *A. nidulans*, изменяло направление гидроксилирования молекулы ПГ грибом *Cochliobolus lunatus* с C11β- на C15α-положение.

В работе [13] показана возможность гидроксилирования некоторых стероидов в органических средах базидиальными лакказами (ЕС 1.10.3.2) [14].

Цель работы — получение нового штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*[−]), способного продуцировать рекомбинантную лакказу А базидиомицета *Trametes hirsuta* 072, оценка влияния генетических изменений в штамме на гидроксилирующую и ацетилирующую способность, а также изучение возможности использования метода твердофазной экстракции (ТФЭ) стероидов из культуральной среды без предварительного отделения мицелия.

МЕТОДИКА

Штаммы. В работе были использованы следующие штаммы микроорганизмов: штамм аскомицета *A. nidulans* 031 (*argB*[−]; *pyrG*[−]) (син. *A. nidulans* (Eidam) G. Winter; AN031; FP-308.1) из кол-

лекции “The CBS-KNAW culture collection”, CBS 129193 (Нидерланды); — ауксотроф штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069 дикого типа (син. FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194), несущий мутации *argB2* и *pyrG89* [15]. Для конструирования плазмиды и бактериальной экспрессии использовали штамм *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США).

Реактивы. Прогестерон (I, ПГ, CAS № 57-83-0, C₂₁H₃₀O₂, М.м. 314.46; “Steraloids Inc.”, США) использовали в качестве исходного субстрата и стандарта. 11α-Гидроксипгестерон (II, 11α-гидроксипгестерон, CAS No. 80-75-1, C₂₁H₃₀O₃, М.м. 330.46; “Steraloids Inc.”, США) и 11α-ацетоксипгестерон (III, 11α-ацетоксипгестерон, CAS № 2268-98-6, C₂₃H₃₂O₄, М.м. 372.5; “Steraloids Inc.”, США) использовали в качестве стандартов. В качестве сорбента использовали Macronet MN-200 (“Purolite Ltd.”, США).

Неорганические соли — фирмы “Fluka” (Germany) и “Amresco” (США), дрожжевой экстракт и агар — “Difco Becton Dickinson”, США и “Sparks”, США, диметилсульфоксид 99.0%-ный (ДМСО) — “Serva”, США.

Культивирование. Штаммы *A. nidulans* культивировали поверхностным способом в течение 7–10 сут при 37°C [10] в термостате на агаризованной минимальной питательной среде (ММ) следующего состава (г/л): NaNO₃ — 0.53, D-глюкоза — 10.0, уридин — 1.1, урацил — 1.2, аргинин — 0.21 (при культивировании трансформантов уридин и урацил не добавляли), раствор минеральных солей, описанный в работе [10], — 20 мл/л.

В качестве посевного материала для глубинного культивирования использовали водную суспензию конидий (4 × 10⁷ конидий/100 мл). При глубинном культивировании трансформантов

A. nidulans для оценки активности лакказы использовали жидкую среду ММ с концентрацией глюкозы 20 г/л. Культивирование проводили на орбитальной качалке Brunswick Innova № 44 (“Eppendorf, inc.”, США) в колбах на 750 мл при 240–250 об./мин и 37°C.

Для культивирования грибов с последующей трансформацией ПГ была использована среда СМ [16] следующего состава (г/л): глюкоза – 40; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0; KH_2PO_4 – 0.74; пептон – 1.0; дрожжевой экстракт – 1.0; L-аспарагин – 0.7 с добавлением уридина, урацила и аргинина в зависимости от использованного штамма, как описано выше.

Конструирование плазмиды pGPD-*lacI*-A.n. Из плазмиды pBGlac [17] с помощью рестрикции по сайтам *AdeI*-*PaeI* был вырезан фрагмент, содержащий ген *lacA* *Trametes hirsuta* (GeneBank:KP027478); из плазмиды pPCGPDPr с помощью рестрикции по сайтам *KpnI*-*PscI* был вырезан фрагмент, содержащий последовательность сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*), из плазмиды pPCGNX [17] по сайтам *NcoI*-*PaeI* был вырезан фрагмент сигнального пептида β -галактозидазы (*BgaS*) *Penicillium canescens*. Полученные фрагменты лигировали в плазмидный вектор pBluescript II KS (+) (“Stratagene”, США), разрезанный по сайтам *KpnI*-*AdeI*. Полученную лигазную смесь (5 мкл) использовали для трансформации компетентных клеток штамма *E. coli* XL10 Gold. Правильность сборки плазмидной конструкции проверяли с помощью рестрикционного анализа препаратов плазмидной ДНК по сайтам *AdeI*-*PaeI* и *KpnI*-*PaeI*. Правильность стыковки по сайтам *PaeI*/*NcoI* проверяли секвенированием (“Евроген”, Россия) с помощью олигонуклеотидного праймера: PCGpd_prom_seq CCCTCTTCCATCCTCCTCCT.

Трансформация *A. nidulans* плазмидой и отбор клонов. Плазида pGPD-*lacI*-A.n. была введена в геном *A. nidulans* 031 (*argB2*, *pyrG89*) ко-трансформацией [18] совместно с плазмидой pJR15 [19], несущей ген *pyrG* *A. nidulans*, с отбором на селективной среде ММ, содержащей 0.2 мМ 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевой соли (АБТС) и 0.1 мМ $CuSO_4$.

Определение активности лакказы. Активность лакказы в культуральной жидкости (КЖ) определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (США), как описано в работе [20], с использованием раствора АБТС в качестве хромогенного субстрата. Измерения проводили в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.5. За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Биотрансформация прогестерона штаммами *A. nidulans*. Водную суспензию конидий готовили смывом с поверхности колоний и по 4×10^7 конидий вносили в качалочные колбы емкостью 750 мл со 100 мл среды СМ. Затем в среду вносили ПГ в виде раствора в ДМСО в концентрации 1.0 г/л, при этом концентрация растворителя составляла 4% (об.). Культуру выращивали на качалке при 37°C в течение 4 сут. Трансформацию проводили в тех же условиях в течение 66 ч для изучения влияния мутаций и наличия плазмиды и 216 ч для оценки возможности применения метода ТФЭ для извлечения продуктов трансформации без отделения мицелия.

Жидкофазная экстракция (ЖФЭ). Извлечение продуктов трансформации ПГ из культуральной среды проводили через 66 ч от начала биотрансформации. Мицелий отфильтровывали на воронке Бюхнера через полотняный фильтр, промывали дихлорметаном (ДХМ) на фильтре. Фильтрат экстрагировали трижды порциями ДХМ равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали под вакуумом, стероиды из водного остатка экстрагировали ДХМ трижды. Объединенные экстракты фильтрата и мицелия промывали водой, осветляли активированным углем и упаривали в вакууме.

Содержание стероидов в остатке оценивали методом количественной ТСХ на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates (“Merck”, Германия). Хроматографировали дважды в этилацетате (ЭА), продукты визуализировали в УФ-свете (254 нм). Содержание стероидов оценивали с применением программы ImageMaster 2D Platinum v.7 (“GE Healthcare”, Швеция). Пластины опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном водном растворе $HClO_4$, а затем проявляли, нагревая при температуре 100–120°C.

Выделение индивидуальных соединений I–IV проводили описанным ранее методом [10]. Хроматографическую чистоту подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Изучение кинетики сорбции стероидов. Измерение кинетики сорбции стероидов из водной среды проводили с использованием сорбента Macronet MN-200 в статических условиях. Использовали модельные растворы/суспензии стероидов. Для каждого испытуемого соединения использовали 15 конических колб емкостью 250–300 мл, содержащих по 100 мл дистиллированной воды. В каждую колбу вносили по каплям при перемешивании по 100 мг стероида в растворе ДМСО, поддерживая температуру 35–40°C. Конечная концентрация стероида составляла 1.0 г/л, а ДМСО – 4% (об.). Содержимое колб охлаждали при перемешивании до комнатной температуры ($26 \pm 2^\circ C$)

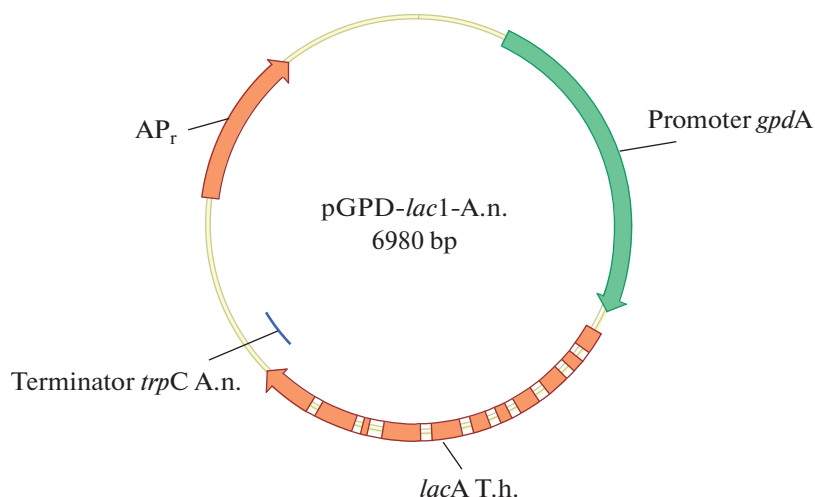


Рис. 2. Карта плазмиды pGPD-lac1-A. n., содержащей ген *lacA*, кодирующий лакказы А гриба *T. hirsuta* 072.

и в каждую колбу помещали капроновый фильтр-пакет с сорбентом Macronet MN-200. Соотношение фаз сорбент : вода составляло 1 : 10 г/об. Фильтр-пакеты готовили из технической капроновой ткани для фильтрации белого цвета и заполняли сухим сорбентом (по 10 г). После приготовления фильтр-пакеты с сорбентом выдерживали в 95%-ном этиловом спирте в течение не менее 3 сут. Перед использованием помещали на 1 ч в стерильную дистиллированную воду.

Процесс сорбции проводили при перемешивании (60–70 об./мин) и температуре 28°C. Через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 48, 72, 96 и 120 ч из каждой колбы извлекали фильтр-пакет с сорбентом, дважды промывали его 20 мл воды от возможных остатков раствора (и/или кристаллов) стероида, водную промывку присоединяли к основной водной фазе. Пакет с сорбентом помещали в колбу на 200–250 мл и добавляли 50 мл ацетона для десорбции стероидного соединения.

Стероид из оставшейся водной фазы экстрагировали этилацетатом трижды по 100 мл. Экстракт упаривали досуха. В остатке определяли содержание стероида с помощью количественной ТСХ.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). Извлечение продуктов трансформации ПГ из трансформационной среды проводили через 216 ч от начала биотрансформации. В каждую колбу помещали фильтр-пакет с сорбентом. Перемешивали при температуре 28°C на качалке (60–70 об./мин) в течение 24 ч. Затем пакет меняли на другой и продолжали перемешивание еще 48 ч в этих же условиях (операцию повторяли дважды). По окончании сорбции пакеты промывали 20 мл воды каждый. Для контроля полноты сорбции мицелий отфильтровывали, добавляли метанол и выдерживали в условиях ре-мацерации, а фильтр-трат КЖ обрабатывали этилацетатом в условиях примера ЖФЭ.

Десорбция. Десорбцию проводили в динамическом режиме, используя аппарат Сокслета с объемом рабочей зоны экстрактора 100 мл, куда помещали 3 фильтр-пакета с сорбентом. В круглодонную колбу на 250 мл наливали 150 мл ацетона и подключали к аппарату. Процесс проводили при перемешивании. Ацетон нагревали до кипения, экстракцию проводили в течение 4 ч. Затем экстрагировали повторно новой порцией ацетона в течение 1 ч для контроля завершения экстракции. Ацетоновый экстракт упаривали до удаления растворителя. Водный остаток (~30–40 мл) обрабатывали этилацетатом трижды по 45 мл, растворитель упаривали досуха. Контроль полноты десорбции осуществляли методом ТСХ. Полная десорбция завершалась за 4 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияния мутации *argB2* и *pyrG89*, а также плазмиды с геном *lacA*, на процесс биотрансформации ПГ изучали с использованием известного штамма *A. nidulans* 031 (*argB*⁻; *pyrG*⁻) [15] и нового штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻).

Получение штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻). Лакказы — медьсодержащие оксидазы, окисляющие ряд фенольных и нефенольных соединений с сопутствующим восстановлением кислорода до молекулы воды без образования пероксида водорода [14]. Для получения продуцента рекомбинантной LacA в штамме *A. nidulans* была создана плаزمида pGPD-lac1-A.n (рис. 2) с геном *lacA* (GeneBank: KP027478) базидиомицета *T. hirsuta* 072, кодирующим LacA (без сигнального пептида лакказы), под контролем сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*) с сигнальным пептидом β-галактозидазы *P. canescens*.

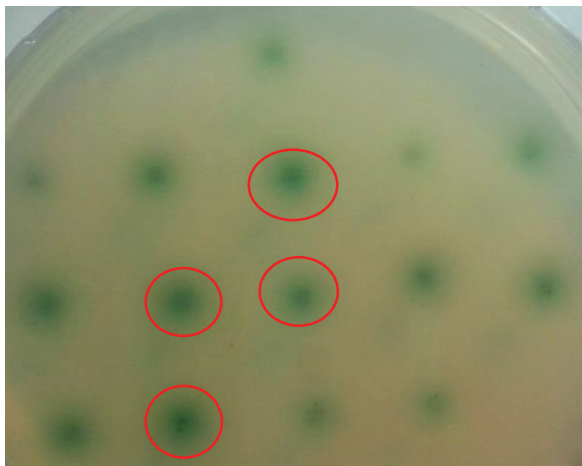


Рис. 3. Первичный отбор трансформантов *A. nidulans* – продуцентов рекомбинантной LacA на среде с АБТС.

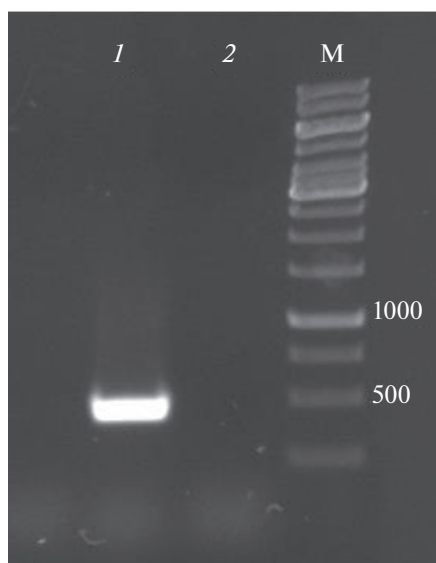


Рис. 4. Электрофорез ПЦР-фрагмента с геномной ДНК: 1 – *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*[–]), 2 – *A. nidulans* 031 (*argB2*[–], *pyrG89*[–]), М – маркеры, bp.

Полученную плазмиду трансформировали в штамм *A. nidulans* 031 (*argB2*[–], *pyrG89*[–]). Преимуществом штамма являлось то, что его геном секвенирован [21] и гены, кодирующие лакказы *sensu stricto*, не были обнаружены. Кроме того, для штамма была разработана эффективная методика трансформации и отбора целевых клонов, в которой в качестве маркерных генов использовали гены *argB* и *pyrG*, комплементирующие мутации *argB2* и *pyrG89* соответственно. В настоящей работе трансформация проводилась совместно с плазмидой pJR15 [19], несущей комплементирующий ген *pyrG* *A. nidulans* с отбором на селективной среде без добавления уридина и урацила.

Тестирование трансформантов на способность продуцировать лакказу. Первичное тестирование полученных трансформантов на способность продуцировать лакказу осуществлялось путем их посева на агаризованную питательную среду ММ, содержащую АБТС в качестве хромогенного субстрата [18, 22, 23]. Колонии, вокруг которых появлялись окрашенные зоны наибольшего размера (30 шт.), были выбраны в качестве потенциальных продуцентов лакказы (рис. 3).

Отобранные трансформанты, перспективные для дальнейшего исследования, потенциально продуцирующие лакказу, культивировали в жидкой питательной среде ММ. Было показано, что максимальная активность рекомбинантной лакказы А в КЖ по субстрату АБТС составляла 2.0 усл. ед./мл у трансформанта *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*[–]) и была сопоставима с активностью рекомбинантной лакказы *Trametes versicolor*, ранее полученной в *A. niger* (2.7 усл. ед./мл [24]), и активностью рекомбинантной лакказы *T. villosa*, полученной в *A. oryzae* (3.0 усл. ед./мл [22]). Наличие плазмиды с геном *lacA* у штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*[–]) подтверждали с помощью ПЦР с геномной ДНК, выделенной из мицелия (рис. 4).

Культурально-морфологические особенности штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*[–]). На агаризованной среде штамм образует круглые колонии диаметром 30–35 мм через 7 сут роста, поверхность колоний ровная, выпуклая, пушистая, текстура средней плотности. Край колоний плотный, ровный. Цвет колоний в зоне спороношения зеленовато-белый, обратная сторона палево-коричневая, экссудат отсутствует. Культура характеризуется умеренным спороношением, споры зеленого цвета.

Биотрансформация ПГ. Влияние изменений в генетическом аппарате штамма на его способность к трансформации стероидов оценивали, сравнивая с результатами трансформации ПГ исходным штаммом дикого типа *A. nidulans* ВКПМ F-1069 [10] и мутантным штаммом *A. nidulans* 031 (*argB*[–]; *pyrG*[–]). Трансформацию ПГ штаммами проводили в течение 66 ч в одинаковых условиях, параллельно культивируя штаммы без ПГ в качестве контроля. Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях.

Результаты биотрансформации ПГ штаммами *A. nidulans* приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, степень превращения (конверсия) ПГ новым штаммом за 66 ч трансформации была значительно выше, чем у *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (*argB*[–]; *pyrG*[–]) – на 10.5 и 17.2% соответственно.

ТФЭ. В работах [10, 25] для извлечения продуктов трансформации ПГ из трансформационной среды с мицелием, использовали метод ЖФЭ. В на-

Таблица 1. Конверсия ПГ штаммами *A. nidulans* на среде СМ и относительная селективность образования продуктов трансформации (мол. %) на 66 ч трансформации*

Стероиды	<i>A. nidulans</i> ВКПМ F-1069	<i>A. nidulans</i> 031 (<i>argB</i> ⁻ ; <i>pyrG</i> ⁻)	<i>A. nidulans</i> lac№4 (<i>argB</i> ⁻)
Конверсия ПГ (I), %	85.39	80.52	94.37
11 α -Гидрокси-ПГ(II)	17.05	13.8	26.51
11 α -Ацетокси-ПГ (III)	29.53	47.4	41.87
6 β ,11 α -Дигидрокси-ПГ (IV)	53.42	38.8	31.62

* Для расчета соотношения продуктов II, III, IV за 100% принимали количество молей конвертированного ПГ.

стоящей работе изучена возможность использования метода ТФЭ для выделения продуктов трансформации ПГ из культуральной среды без предварительного разрушения или отделения мицелия. В качестве сорбента был использован Macronet MN-200 — неионогенный макропористый полистирол, сшитый дивинилбензолом, один из перспективных полимеров для применения в биотехнологических процессах. Важным является также то, что сорбент легко регенерируется, полностью отдавая поглощенные вещества при обработке органическим растворителем [26, 27]. Предварительно было проведено изучение кинетики сорбции ПГ и мажорных продуктов его биотрансформации этим сорбентом из водной среды.

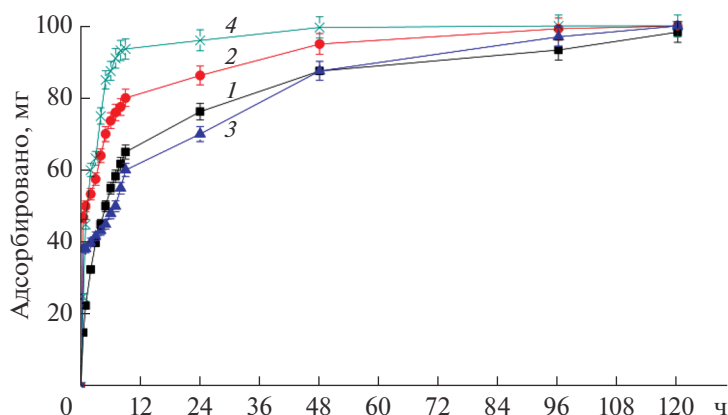
Кинетика сорбции стероидов из водной среды. Для определения оптимального времени контакта сорбента с трансформационной средой изучали кинетику сорбции ПГ (I) и продуктов его трансформации (11 α -гидрокси-ПГ (II), 11 α -ацетокси-ПГ(III) и 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ (IV)) из модельных растворов (или суспензий). Следует отметить, что, если соединения II и IV, вносимые в воду в виде раствора в ДМСО, образовывали растворы, то при добавлении в воду растворов I и III в ДМСО наблюдалось образование мелкокристаллической суспензии, что, вероятно, было обусловлено ограниченной растворимостью этих

соединений в воде. Известно, что растворимость ПГ в дистиллированной воде при комнатной температуре составляет 16.8 мкг/мл [28].

После помещения фильтр-пакета с сорбентом в модельный раствор (суспензию) содержимое колбы перемешивали, что обеспечивало диффузию раствора стероида через капроновый фильтр внутрь пакета и обратно жидкости без стероида. Внутри пакета протекал процесс сорбции стероида из раствора. Вне пакета происходило постепенное растворение кристаллов стероида. Скорость перемешивания 60–70 об./мин была минимально необходимой для обеспечения диффузии и процесса сорбции без механического истирания гранул сорбента.

Капроновый фильтр-пакет защищал сорбент от налипания на гранулы полимера кристаллов стероидного соединения, не препятствуя при этом сорбции растворенного стероида из жидкой фазы. Определение количества остаточного стероида в колбе проводили по истечении условленного времени. На основании экспериментальных данных были построены кинетические кривые сорбции соединений I, II, III и IV (рис. 5).

Как видно из рис. 5, сорбция соединений II и IV из растворов протекала значительно быстрее, чем для соединений I и III из их суспензий. Полная сорбция соединения IV проходила за 48 ч, а

**Рис. 5.** Кинетические кривые адсорбции ПГ и мажорных продуктов на Macronet MN-200. 1 — ПГ, 2 — 11 α -гидрокси-ПГ, 3 — 11 α -ацетокси-ПГ, 4 — 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ.

соединения II за 96 ч. Сорбция соединения III завершалась через 120 ч. При этом через 120 ч сорбционного процесса содержание I в водной фазе составило 0.75 мг, то есть менее 1% от внесенного для трансформации. Особенностью процессов адсорбции в случае соединений I и III является более медленное достижение сорбционного равновесия, так как в этих случаях скорость процесса переноса вещества зависит от скорости перехода вещества из твердой фазы в раствор, диффузии растворенного вещества в растворе через капроновый фильтр и удаления его из раствора в результате адсорбции на полимере.

Полученные результаты позволили заключить, что оптимальная продолжительность контакта сорбента с КЖ составляла 120 ч.

Извлечение стероидов из трансформационной среды. Ранее [10] было показано, что в аналогичных условиях трансформации ПГ штаммом *A. nidulans* ВКПМ F-1069 образование максимального количества продукта IV достигалось через 96 ч и не изменялось в дальнейшем. Процесс ферментативного ацетилирования 11 α -гидроксильной группы соединения II, напротив, продолжался и после того, как 6 β -гидроксилирование прекращалось. При этом полная конверсия исходного субстрата I, а также интермедиата II, происходила за 216 ч трансформации. Для изучения возможности использования метода ТФЭ для извлечения продуктов биоконверсии ПГ штаммом *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) трансформацию проводили в течение 216 ч.

По окончании биотрансформации ПГ грибом *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) извлечение продуктов из трансформационной среды проводили в тех же качалочных колбах без отделения мицелия, помещая фильтр-пакет с сорбентом в колбу. Полноту сорбции оценивали хроматографически, отбирая пробы из трансформационной среды каждые 4–6 ч. Периодически пакет с сорбентом заменяли. Применение капронового фильтр-пакета защищало сорбент от загрязнения частицами ростовой среды и налипания на гранулы полимера мицелия, не препятствуя при этом сорбции растворенных стероидов из жидкой фазы. Для контроля полноты сорбции мицелий отделяли фильтрованием от жидкой фазы. Проводили ремацерацию мицелия метанолом, а фильтрат обрабатывали этилацетатом в условиях ЖФЭ. По данным ТСХ анализа в фильтрате и мицелии ПГ и продукты его трансформации отсутствовали.

По окончании сорбции проводили десорбцию стероидов с сорбента в фильтр-пакетах. Как правило, десорбцию стероидов с носителя проводят смешивающимися (алифатическими спиртами, ацетоном и др.) или не смешивающимися с водой растворителями (ароматическими углеводородами, эфирами уксусной кислоты, хлороформом, дихлорметаном и др.), а также их смесями [29, 30].

Десорбцию стероидов проводили в динамическом режиме ацетоном в аппарате Сокслета. Контроль полноты десорбции осуществляли методом ТСХ, анализируя содержимое экстрактов. Полная десорбция завершалась за 4 ч. При этом содержание продуктов в экстракте было следующим (мол. %): 11 α -гидрокси-ПГ – 1.43; 11 α -ацетокси-ПГ – 49.91; 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ – 22.49. На основании анализа полученных результатов был сделан вывод, что за 216 ч трансформации достигалась практически полная конверсия исходного субстрата ПГ, а относительная селективность образования мажорных продуктов трансформации составляла (мол. %): 11 α -гидрокси-ПГ – 1.94; 11 α -ацетокси-ПГ – 67.6; 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ – 30.46.

Ранее сообщалось о применении сорбционно-го способа для извлечения некоторых стероидов рядов прегнана и андростана из КЖ. Так, в патенте [31] описан способ использования сильноокислотного набухающего катионита для извлечения эпи-гидрокортизона и гидрокортизона из их КЖ после трансформации кортексолона (вещество “S” Рейхштейна) с концентрацией 0.5 и 0.6 г/л соответственно. При этом сорбцию проводили из культуральной среды после отделения мицелия. Синтетические неполярные макросетчатые полимерные сорбенты, синтезированные на основе дивинилбензола, нашли применение в ферментативном получении 3,17-дикетоандростанов, например, андрост-4-ен-3,17-диона, из стероидов [32] благодаря их способности селективно сорбировать 3,17-дикетоандростаны. Применение макросетчатого сорбента для извлечения продуктов трансформации ПГ из трансформационной среды без отделения мицелия описано нами впервые.

Полученные результаты показали, что наличие мутации у штамма *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) – продуцента гетерологичной лакказы А, не влияло на качественный состав мажорных продуктов трансформации ПГ, но приводило к изменению их количественного содержания. Следует отметить, что продукты II и III являются важными предшественниками в производстве высокоактивных стероидных соединений, в частности, адренокортикоидов [33]. Они также могут применяться как самостоятельные препараты с гестагенной и антиандрогенной активностью [34–36], причем 11 α -гидрокси-ПГ (II) известен как регулятор кровяного давления [37] и обладает нейропротекторной активностью [38]. Соединение 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ (IV) может быть превращено в 11 α -гидрокси-ПГ (II) известным способом [39].

Таким образом, штамм *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) оказался более эффективным биокатализатором для трансформации ПГ в 11 α -ацетокси-ПГ (III) и 11 α -гидрокси-ПГ (II). Штамм можно рассматривать как перспективный объект для изучения его стероидтрансформирующей активности с ис-

пользованием других модельных стероидов, например, кортексолона (вещество “S” Рейхштейна) и андроста-4-ен-3,17-диона.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00653 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. Пособие для врачей. М.: Новая волна, 2005. P. 579–580.
2. *Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.* // *Enz. Microb. Technol.* 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
3. *Donova M.V., Egorova O.V.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 94. № 6. P. 1423–1447.
4. *Lam K.S.* Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry: Discovery, Development, and Manufacturing. / Ed. J.A. Tao, G-Q Lin, A. Liese, N.Y.: Wiley, 2010. P. 213–227.
5. *Souness G.W., Latif S.A., Laurenzo J.L., Morris D.J.* // *Endocrinology.* 1995. V. 136. № 4. P. 1809–1812.
<https://doi.org/10.1210/endo.136.4.7895695>
6. *Dutta T.K., Samanta T.B.* // *Curr. Microbiol.* 1999. V. 39. № 6. P. 309–312.
<https://doi.org/10.1007/s002849900464>
7. *Henry M.J., Sisler H.D.* // *Pestic. Biochem. Physiol.* 1984. V. 22. № 3. P. 262–275.
[https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90019-1)
8. *El-Refai A.H., Ghanem K.M.* // *Egyptian J. Microbiol. (EJM)* 1987. V. 22. № 2. P. 327–338.
9. *El-Refai A.H., Ghanem K.M.* // *Egyptian J. Microbiol. (EJM)* 1989. V. 23. № 1. P. 1–11.
10. *Savinova O.S., Solyev P.N., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V., Savinova T.S.* // *Steroids.* 2019. V. 149. Article 108421.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.05.013>
11. *Dermastia M., Rozman D., Komel R.* // *FEMS Microbiology Letters* 1991. V. 77. № 2–3. P. 145–150.
12. *Rozman D., Komel R.* // *Curr Genet.* 1992. V. 22. № 2. P. 123–127.
<https://doi.org/10.1007/BF00351471>
13. *Khomutov S.M., Shutov A.A., Chernikh A.M., Myasoe-dova N.M., Golovleva L.A., Donova M.V.* // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2016. V. 123. P. 47–52.
14. *Baldrian P.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. V. 30. № 2. P. 215–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
15. *Christensen U., Gruben B.S., Madrid S., Mulder H., Nikolaev I., de Vries R.P.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 19. P. 7084–7087.
16. *Čapek A., Tadra M., Tůma J.* // *Folia Microbiologica.* 1964. V. 9. № 6. P. 380–382
17. *Абянова А.Р., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Федорова Т.В., Логинов Д.С., Королева О.В., Беневоленский С.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 342–347.
18. *Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J.* // *Curr. Genet.* 1995. V. 28. № 5. P. 474–477.
<https://doi.org/10.1007/BF00310818>
19. *Oakley B.R., Rinehart J.E., Mitchell B.L., Oakley C.E., Carmona C., Gray G.L., May G.S.* // *Gene.* 1987. V. 61. № 3. P. 385–399.
20. *Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V.* // *Biochimie.* 2017. V. 142. P. 183–190.
21. *Galagan J.E., Calvo S.E., Cuomo C., Ma L.J., Wortman J.R., Batzoglou S. et al.* // *Nature.* 2005. V. 438. № 7071. P. 1105–1115.
22. *Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalborge H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 3. P. 834–841.
23. *Berka R.M., Schneider P., Golightly E.J., Brown S.H., Madden M., Brown K.M., Halkier T., Mondorf K., Xu F.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. № 8. P. 3151–3157.
24. *Bohlin C., Jönsson L.J., Roth R., van Zyl W.H.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 129. P. 195–214.
25. *Савинова О.С., Васина Д.В., Сольев П.Н., Федорова Т.В., Тяжелова Т.В., Савинова Т.С.* // Актуальная биотехнология. 2018. Т. 3. № 26. С. 258.
26. <https://www.purolite.com/product-pdf/MN200.pdf>
27. *Tsyurupa M.P., Davankov V.A.* // *React. Funct. Polym.* 2002. V. 53. № 2–3. P. 193–203.
[https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00173-6](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00173-6)
28. *Haskins A.L.* // *Proc. Society for Experimental Biology and Medicine.* 1949. V. 70. № 2. P. 228–229.
29. *Парбузина И.Л., Маслина Т.И., Калинкина З.В., Романчук М.А.* // Хим.-фарм. журн. 1973. Т. 7. № 12. С. 34–38.
30. Патент РФ. № 2049792. 1995.
31. Патент США. № 3356695. 1967.
32. Патент РФ. 2003. № 2205224.
33. *Zohri A.A.* // *Folia Microbiol. (Praha).* 2000. V. 45. № 5. P. 391–396.
34. Патент Германии. 1979. № 2757024.
35. Патент РФ. 2011. № 2432952.
36. *Savechenkov P.Y., Chiara D.C., Desai R., Stern A.T., Zhou X., Ziemba A.M., Szabo A.L., Zhang Y., Cohen J.B., Forman S.A., Miller K.W., Bruzik K.S.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2017 V. 136. P. 334–347.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.043>
37. *Habibi Z., Yousefi M., Ghanian S., Mohammadi M., Ghasemi S.* // *Steroids.* 2012. V. 77. P. № 13. 1446–1449.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.043>
38. *Yamaguchi T., Lee J.-H., Lim A.-R., Yu E.-J., Oh T.-J.* // *Steroids.* 2019. V. 145. P. 32–38.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.02.008>
39. Патент США 1957. № 2787624.

Obtainment of *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*[−]) and its Application for Progesterone Transformation

O. S. Savinova^{a,*}, A. M. Chulkin^a, T. S. Savinova^b, E. A. Vavilova^a,
D. V. Vasina^a, P. N. Solyev^c, and T. V. Fedorova^a

^a*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Moscow, 119071 Russia*

^b*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991 Russia*

^c*Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow 119991 Russia*

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

The strain of *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*[−]) – a producer of the recombinant laccase A of basidiomycete *Trametes hirsuta* 072 – was obtained. A biocatalytic transformation of progesterone (PG) was carried out with a new strain. 11 α -Hydroxy-PG, 11 α -acetoxy-PG and 6 β ,11 α -dihydroxy-PG were the major biotransformation products. The kinetics of sorption of PG and the main products of its biotransformation from the transformation medium using the Macronet MN-200 sorbent were studied. The effectiveness of steroids solid-phase extraction method without preliminary separation of the mycelium has been proposed.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, laccase, *Trametes hirsuta*, solid phase extraction, Macronet MN-200, progesterone, 11 α -hydroxyprogesterone, 11 α -acetoxyprogesterone, 6 β ,11 α -dihydroxyprogesterone

УДК 579.25:579.6:663.252

ПРИРОДНЫЕ ШТАММЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИН ТИПА ХЕРЕС

© 2020 г. С. А. Кишковская¹, Т. Н. Танащук¹, М. Ю. Шаламитский¹, В. И. Загоруйко¹, М. И. Ширяев², Д. А. Авданина², М. А. Эльдаров², Н. В. Равин², А. В. Марданов², *

¹Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарах” РАН, Ялта, 298600 Россия

²Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

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

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Предложен методический подход к поиску перспективных для производства вина типа херес природных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, основанный на их первичном отборе с использованием генетических маркеров и последующем изучении их энологических свойств. Из образцов винограда выделено 96 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. Генотипирование штаммов выявило у 82 характерную для “винных” штаммов аллель спейсера ITS1 генов рибосомной РНК, а 14 имели аллель, характерную для французских “хересных” штаммов. Аллели, специфичной для испанских “хересных” дрожжей, не были обнаружено. У 11 штаммов в промоторе гена адгезина *FLO11* найдена типичная для “хересных” дрожжей делеция размером 111 п. н., а специфическая аллель гена *YDR379C-A* выявлена у 20. В целом, 28 штаммов обладали хересной аллелью хотя бы для одного из трех локусов, а 21 из них образовывал пленку на поверхности сброженного виноградного сусла. По результатам генетических исследований и оценки энологических свойств были отобраны 5 штаммов, характеризующихся наличием хересных аллелей для трех локусов, а также способных к пленкообразованию. Испытание штаммов в условиях микроиноделия позволило рекомендовать 2 штамма в качестве наиболее перспективных для дальнейшей производственной селекции.

Ключевые слова: хересные дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*, ITS, Flo11, генотипирование, физиолого-биохимические свойства, пленкообразование, альдегидообразование

DOI: 10.31857/S055510992003006X

Херес — вино с уникальными особенностями букета и вкуса, которые приобретаются в результате длительной биологической выдержки вино-материала под дрожжевой пленкой. Важная роль хересных дрожжей в производстве вин типа херес хорошо известна [1–3], так как в промышленном масштабе это вино без специальных штаммов дрожжей получить невозможно. Традиционно для этих целей используют дрожжи, относящиеся по принятой в виноделии систематике В.И. Кудрявцева [4] к виду *Saccharomyces oviformis* var. *chervisiensis*. По современной систематике [5] они относятся к *Saccharomyces cerevisiae*.

В сравнении с бродильными штаммами *S. cerevisiae* хересные дрожжи имеют отличительные характеристики. Основными из них являются их способность формировать пленку на поверхности вино-материала и в этих условиях роста окислять этанол в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы. Пленкообразование и окислитель-

ный метаболизм являются адаптационными механизмами, которые позволяют клеткам выживать при таких условиях.

Сведения о свойствах хересных дрожжей получены в основном при изучении производственных хересных популяций [1, 2, 6, 7]. Однако вопросы происхождения и распространения хересных дрожжей остаются не решенными. Так не было известно, встречаются ли они на винограде в природе или их можно обнаружить только в производственных условиях, в которых они сформировались в результате длительной селекции.

Использование современных геномных и постгеномных инструментов способствует углублению представлений о природе молекулярных различий, лежащих в основе фенотипического разнообразия дрожжей-сахаромицетов, связи между их молекулярно-генетическими данными и биотехнологическими свойствами [8, 9]. Следует ожидать, что эти знания будут способствовать

разработке стратегий отбора и селекции новых промышленно ценных штаммов хересных дрожжей *S. cerevisiae*, направленных на совершенствование технологии производства вин типа Херес.

Цель работы — выделение природных штаммов дрожжей и отбор на основании изучения их молекулярно-генетических и энологических свойств перспективных штаммов для производства вин типа Херес пленочным способом.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Объектами исследования служили природные изоляты дрожжей, выделенные в сезоны виноделия 2016 и 2018 гг. из 101 пробы винограда, произрастающего в виноградо-винодельческих хозяйствах шести климатических зон Республики Крым [10] и Ростовской области (Россия). Количество отобранных штаммов дрожжей зависело от количества исследованных виноградных участков климатической зоны и сортового состава винограда. Контролем служил селекционный штамм I-329 из коллекции микроорганизмов виноделия “Магарах” (КМВ “Магарах”, Россия), применяемый в производстве вин типа Херес.

Выделение природных штаммов дрожжей. Здоровые неповрежденные ягоды винограда отделяли от гребней, дробили и оставляли на 4 ч. Полученную мезгу отжимали, сусло разливали в склянки, закрытые ватно-марлевой пробкой. Через 48 ч после начала брожения пробы сусла высевали на агаризованное виноградное сусло и инкубировали при $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Характерные для дрожжей-сахаромицетов колонии переносили в пробирки с виноградным суслом и культивировали при температуре $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ до появления признаков брожения.

Среда и условия культивирования. Среда и условия культивирования описанные ранее [7] соответствовали требованиям и рекомендациям по приготовлению вин типа херес [11]. Дрожжи культивировали при $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в пастеризованном виноградном сусле из винограда сорта Алиготе с массовой концентрацией сахаров 210 г/л, титруемых кислот 7.0 г/л и pH 3.2. Для инокуляции использовали 2-суточную дрожжевую разводку в физиологически активном состоянии, содержащую 60–80 млн кл/мл, количество почкующихся клеток не менее 30% и мертвых клеток не более 2% [1].

Морфологию и физиологическое состояние клеток описывали при микроскопировании на стадии активного роста (2–3-суточная культура), осадок — визуально на стадии осветления выбродившего сусла. Размеры клеток определяли по цифровым изображениям, используя световой микроскоп XY-B2 (“Ningbo Sunny Instruments”, Китай) и компьютерную программу “Image Scope M”.

Бродильная способность штаммов. Бродильную способность оценивали при культивировании на пастеризованном виноградном сусле в колбах объемом 100 мл. В сусло вносили дрожжевую разводку из расчета 2×10^6 кл/мл, закрывали бродильными затворами и инкубировали при $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$, ежедневно взвешивая. По окончании процесса брожения (отсутствие изменения массы) в виноматериалах определяли концентрацию сахаров, спирта, летучих кислот и альдегидов.

Способность штаммов образовывать сероводород. Способность к выделению сероводорода изучали на плотной питательной среде BIGGY (“Merck”, Германия) [12]. Посевы культивировали в течение 24 ч при температуре 30°C . Присутствие H_2S в среде оценивали визуально, используя следующую шкалу: белый цвет — сероводород не образуется; светло-коричневый цвет — низкое образование сероводорода; темно-коричневый цвет — среднее образование сероводорода; черный цвет — высокое образование сероводорода.

Способность штаммов к пленкообразованию. Способность штаммов к пленкообразованию определяли по росту пленки на поверхности сброженного сусла. В лабораторных условиях пастеризованное виноградное сусло сбраживали в склянках объемом 100 мл, в условиях микровиноделия использовали свежее сусло, которое сбраживали в 3-литровых баллонах. Образцы закрывали ватно-марлевыми пробками и инкубировали при $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Разводку дрожжей вносили в количестве 2%. Рост пленки на поверхности фиксировали ежедневно после окончания брожения: начало роста — при наличии первых островков, окончание — при зарастании всей поверхности. Состояние пленки оценивали визуально [7].

Энологические свойства. При проведении исследований были использованы подходы и методы, общепринятые в микробиологии виноделия. Дрожжи оценивали по показателям, принятым при проведении селекции промышленных штаммов дрожжей для производства виноградных вин [11].

Аналитические исследования. Массовую концентрацию летучих кислот определяли по ГОСТ 32001-2012, массовую концентрацию альдегидов по ГОСТ 12280-75. Содержание остаточных сахаров и этилового спирта определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Supelcogel C610H на хроматографе LC Prominence (“Shimadzu”, Япония).

Таксономическая идентификация природных штаммов и их генотипирование по ITS маркерам. Предварительную идентификацию изолятов на принадлежность к роду *Saccharomyces* проводили классическими методами по стандартным характеристикам: морфология клеток, способ вегетативного размножения, способность к спорообразованию, морфология аскоспор [13]. Выделение

препаратов ДНК из клеток дрожжей осуществляли по методике, описанной ранее [7]. Для молекулярно-генетической идентификации и отнесения к “винным” или “хересным” штаммам дрожжей использовали метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ПЦР-фрагментов участков повтора рДНК, включающих два “внутренних транскрибируемых спейсера” (ITS1 и ITS2) и ген 5.8 рРНК [14]. Для ПЦР использовали праймеры *Its1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и *Its4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазой *HaeIII* и после анализа электрофореграмм относили штаммы к “винным” или к “хересным”. Для “винных” штаммов дрожжей *S. cerevisiae* характерно образование фрагментов размером 311, 230, 172 и 128 п.н., а для “хересных” — 311, 230, 148 и 129 п.н. Для отнесения “хересных” штаммов дрожжей *S. cerevisiae* к “французскому” или “испанскому” типу проводили обработку ПЦР-фрагментов рестриктазой *HhaI*. Для “испанских” аллелей характерно образование фрагментов размером 342, 340 и 133 п.н., для “французских” — 364, 336 и 132 п.н. [14]. Если полученные в результате ПДРФ анализа фрагменты по длинам не были характерны для дрожжей вида *S. cerevisiae*, то эти ПЦР-фрагменты секвенировали по методу Сенгера на ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США) и проводили таксономическую идентификацию штамма на основе анализа полученных последовательностей.

Анализ полиморфизма промотора гена *FLO11*. Штаммы, несущие “полноразмерный” и “укороченный” (делеция размером 111 п.н.) варианты промотора гена *FLO11*, выявляли методом ПЦР-анализа с праймерами *Flo11D.REV* (5'-TTTGGGCGACATTTCTTGT-3') и *Flo11D.FOR* (5'-CCACGGGTGAGATTGTTCT-3'). Регистрировали образование фрагментов размером около 400 или 300 п.н., характерных для этих двух аллелей гена *FLO11*, “хересного” и “винного” соответственно [15].

Анализ полиморфизма гена *YDR379C-A*. Для выявления штаммов с винными и хересными аллельными вариантами данного гена использовали ПДРФ-анализ ПЦР-фрагментов, полученных с праймерами *F_sdh6* (5'-TCGCGTCAACTTGTTTTGAG-3') и *R_sdh6* (5'-ATTCGTCAAGTTCAGGGTG TGA-3'). Фрагменты, имевшие длину 885 п.н., обрабатывали рестриктазой *AflIII* [16]. Для “хересных” аллелей наблюдали образование фрагментов 500 и 385 п.н. У “винных” аллелей размер фрагмента оставался неизменным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация природных изолятов дрожжей и формирование рабочей коллекции штаммов рода *Saccharomyces*. Из 101 пробы винограда выделено

и проанализировано 626 изолятов дрожжей. По результатам оценки их морфолого-культуральных свойств на принадлежность к роду *Saccharomyces* отобрали 102 штамма дрожжей (табл. 1), для которых отмечена морфологическая однородность и спорообразование. Клетки дрожжей округлой, яйцевидной и овальной формы, средних и крупных размеров, округлые — (5.35 ± 0.34) мкм; яйцевидные — $(4.05 \pm 0.85) \times (5.65 \pm 0.5)$ мкм и овальные — $(7.15 \pm 0.66) \times (3.54 \pm 0.58)$ мкм; размножение почкованием, споры округлые гладкие, от 1 до 4 в аске. Необходимо отметить, что многие природные штаммы дрожжей отличаются дефектами споруляции, а в асках часто содержится менее 4 спор [17].

Генотипирование отобранных штаммов дрожжей. Генотипирование на основании анализа участка межгенного спейсера рДНК подтвердило принадлежность 96 из 102 отобранных штаммов к виду *S. cerevisiae*. По данным секвенирования ITS последовательностей остальные 6 штаммов были отнесены к видам *Starmerella bacillaris* (1 штамм), *Lachancea thermotolerans* (3 штамма) и *Torulaspora delbrueckii* (2 штамма). Эти виды часто встречаются в природе на поверхности ягод винограда [18]. Таким образом, была сформирована рабочая коллекция из 96 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*.

По данным анализа ITS локуса 82 штамма имели последовательность, характерную для “винных” штаммов и 14 — для “французских хересных” [14], а “испанских хересных” аллелей у анализируемых штаммов обнаружено не было (табл. 2).

Для многих “хересных” штаммов характерна делеция размером 111 п.н. в положении от [–1313] до [–1203] промотора гена адгезина *FLO11*, приводящая к усилению его экспрессии [15]. Такая делеция присутствовала у 4 штаммов, а еще 7 штаммов были гетерозиготными (табл. 2). Повидимому, штаммы с гетерозиготными аллелями были диплоидами или полиплоидами, что достаточно широко распространено среди природных и промышленных штаммов [19].

Также для генотипирования использовали ПДРФ маркер локуса *YDR379C-A*, разработанный на основании сравнения геномов хересных и винных штаммов. Данный локус, кодирующий SDH6-субъединицу митохондриальной сукцинатдегидрогеназы, содержит полиморфизмы, характерные для хересных штаммов дрожжей [16]. Один из SNP приводит к образованию у хересных штаммов сайта *AflIII*, что позволяет отличать “хересные” аллели от “винных” методом ПДРФ. Специфические для хересных дрожжей аллели гена *YDR379C-A* были выявлены у 17 штаммов, при этом 3 штамма были гетерозиготными (табл. 2).

Пять штаммов (№ 3, 23, 109, 111, 113) оказались “хересными” по всем трем маркерам и могли ока-

Таблица 1. Происхождение выделенных штаммов дрожжей

Регион выращивания винограда		Номера штаммов, выделенных в 2016 г.	Номера штаммов, выделенных в 2018 г.
Ростовская область Бегаевский р-н		1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 24, 25, 27, 29, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58	—
Республика Крым	Южный берег Крыма	7, 9, 13, 22, 26, 30, 35, 52	76, 87, 88, 89, 90, 91, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 108, 109, 110, 111, 112, 113
	Предгорный район	16, 17, 19, 21, 23, 28, 42, 43, 45, 46, 47, 53	—
	Западный предгорно-приморский район	39	60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 92, 93, 94, 95, 96, 106, 107
	Горно-долинный приморский район	11	—
	Горно-долинный	—	70, 71, 74, 75, 105
	Западный приморско-степной район	—	84, 85, 86

Таблица 2. Генотипирование природных штаммов дрожжей *S. cerevisiae**

Число штаммов	Номер штамма	ITS	FLO11	YDR379C-A
68	1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 47, 50, 51, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 80, 81, 82, 83, 87, 88, 89, 91, 92, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107	W	W	W
1	53	W	F/W	W
2	52, 90	W	F	W
5	45, 49, 78, 79, 112	W	W	F
3	71, 97, 108	W	W	F/W
1	110	W	F	F
2	46, 54	W	F/W	F
5	19, 28, 74, 75, 76	F	W	W
4	4, 18, 27, 77	F	W	F
4	3, 109, 111, 113	F	F/W	F
1	23	F	F	F
Контроль	I-329	F	F	F

* Показано распределение аллелей, характерных для винных (W) и хересных (F) штаммов; F/W, — гетерозиготы.

заться перспективными для дальнейшей селекционной работы.

Энологическая характеристика выделенных штаммов дрожжей на стадии сбраживания виноградного сусла. Паспортизация промышленно-ценных культур винных дрожжей, наряду с общеприняты-

ми микробиологическими подходами, предполагает исследование их свойств, соответствующих технологии получения вин определенного типа. При рекомендации штаммов для виноделия, прежде всего, исследуют их бродительную способность и образование ими летучих кислот. Низкая

Таблица 3. Энологическая характеристика отобранных штаммов *S. cerevisiae*

Штамм, №	Способность к синтезу H ₂ S*	Пленкообразование**	Концентрация в виноматериале			Объемная доля этилового спирта, %	Изменение количества альдегидов после выдержки на осадке, мг/л
			сахаров, г/л	летучие кислоты, г/л	альдегиды, мг/л		
3	++	+	1.9	0.78	65.9	12.6	+64.6
4	++	—	2.9	0.75	67.8	12.7	0
18	++	—	1.7	0.45	134.0	13.2	0
19	—	++	0.2	0.37	71.3	13.0	+79.4
23	++	++	2.3	0.46	105.6	13.1	+143.4
27	++	—	1.9	0.56	98.7	12.9	0
28	—	+++	0.9	0.35	73.0	12.8	+723.4
45	+	+++	1.9	0.64	84.5	12.2	+751.5
46	++	++	2.1	0.54	95.6	12.3	+25.0
49	++	++	2.8	0.72	91.9	12.3	+88.3
52	++	+	1.8	0.6	27.8	12.3	+68.9
53	—	+++	1.1	0.21	34.3	12.9	+748.9
54	+	++	0.1	0.59	148.7	12.7	+704.9
71	+	+	0.2	0.5	75.7	12.6	+95.9
74	—	+	0.4	0.6	37.8	12.7	+120.6
75	—	—	0.1	0.69	128.5	12.5	0
76	+	—	0.6	0.81	124.9	12.5	0
77	—	+	0.8	0.8	184.0	12.6	+26.0
78	—	+	0.6	0.75	154.9	12.6	0
79	—	++	2.1	0.7	91.5	12.9	+66.9
90	+	—	2.1	0.3	45.6	12.1	0
97	—	+	0.8	0.4	202.4	12.9	0
108	+	+	0.5	0.24	183.0	12.7	0
109	—	+	0.3	0.72	283.4	12.7	+42.2
110	—	+	0.7	0.9	253.4	12.5	+10.6
111	+	+++	0.6	0.66	279.8	12.9	+130.0
112	—	—	1.6	0.54	176.0	12.3	0
113	—	++	1.2	0.87	176.0	12.6	+83.6
Контроль I-329	+	+++	1.2	0.1	179.6	12.7	+335.2

* Способность к образованию сероводорода: — отсутствует, + — слабая, ++ — средняя.

** Способность к пленкообразованию: — отсутствие пленки, + — пленка в виде единичных островков, ++ — пленка до 2/3 площади поверхности, +++ — пленка на всей поверхности.

бродильная активность штаммов, связанная с неполным выбраживанием сахаров виноградного сусла, может быть одним из факторов, отрицательно влияющим на формирование пленки [20]. Активность гена адгезина *FLO11*, играющего ключевую роль в формировании дрожжевой пленки, подавляется, когда в среде присутствует глюкоза [21].

Энологические характеристики определяли для 28 штаммов, имевших “хересный” аллель хотя бы в одном из трех локусов, по которым проводили генотипирование (табл. 2). Исследование их

бродильной способности показало, что штаммы в оптимальные для виноделия сроки полностью сбраживали сахар с образованием спирта в диапазоне 12.1–13.1 об. %. Отмечены существенные отличия штаммов по синтезу летучих кислот, количество которых в виноматериалах варьировало от 0.21 до 0.90 г/л (табл. 3).

Одним из основных критериев при выборе штамма дрожжей для первичного виноделия является его способность при брожении образовывать сероводород. Образование сероводорода при

Таблица 4. Скорость образования пленок природными штаммами дрожжей

Штамм, №	Продолжительность брожения на вино-градном сусле, сут	Рост пленки, сут			
		на сброженном сусле		на виноматериале	
		начало	по всей поверхности	начало	по всей поверхности
3	15	8	20	2	7
23	15	10	20	4	9
111	17	10	20	8	18
113	18	12	25	8	20
I-329 (контроль)	11	10	18	2	6

брожении виноградного сусла во многом зависит от штамма дрожжей и относится к наследственным признакам [23]. Однако присутствие сероводорода в вине в количествах, превышающих порог вкусовой чувствительности, может привести к появлению посторонних тонов [22]. Способность к образованию сероводорода при брожении виноградного сусла во многом зависит от штамма дрожжей и является наследственным признаком [23]. Исследование способности выделенных штаммов к образованию H_2S (по его наличию в питательной среде) показало, что 13 изолятов не проявляли заметной способности к его синтезу, 7 изолятов являлись слабыми продуцентами, а 8 изолятов характеризовались как среднеактивные продуценты.

Важной отличительной особенностью хересных дрожжей является их способность к поверхностному росту на виноматериале. Исследование этой способности у 28 отобранных штаммов показало, что 21 штамм из них образовывал пленку на поверхности сброженного сусла (табл. 3).

Для хересных виноматериалов основным технологическим показателем является концентрация альдегидов, количество которых при удалении виноматериала из-под пленки должно составлять не менее 350 мг/дм³. Штаммы хересных дрожжей могут значительно отличаться по образованию альдегидов и способствовать накоплению в виноматериале альдегидов, содержание которых может достигать 900 мг/дм³ [7]. Исследуемые штаммы обладали различной способностью к синтезу альдегидов. Так, в сброженном сусле содержание альдегидов составляло от 27,8 (№ 52) до 283,4 мг/л (№ 109). При последующей двухмесячной выдержке образцов наблюдали увеличение количества альдегидов у 17 штаммов дрожжей, проявивших способность к поверхностному росту (табл. 3). Максимальный прирост альдегидов в образцах (около 700 мг/л) был отмечен для дрожжей с высокой пленкообразующей способностью, а отсутствие заметных изменений — дрожжей, не образовавших пленку.

Отбор перспективных штаммов *S. cerevisiae* для производства вин типа Херес. Для выбора перспек-

тивных для производства хересных вин штаммов дрожжей-сахаромицетов были проанализированы результаты молекулярно-генетических исследований (табл. 2) и энологические характеристики (табл. 3) 28 штаммов, имеющих “хересные” аллели.

Исследование энологических свойств образцов виноматериалов показало, что все они соответствовали требованиям, предъявляемым к виноматериалам для получения вин типа Херес.

Из 11 штаммов, имеющих хересные аллели (в гомо- или гетерозиготном состоянии) по гену *FLO11*, 10 проявляли способность к образованию пленки на поверхности виноматериала. Из 20 штаммов, имеющих хересные аллели по маркеру *YDR379C-A*, 16 — также обладали способностью образовывать пленку. При выдержке под пленкой штаммы проявляли различную способность к накоплению альдегидов.

По результатам генетических исследований и оценки энологических свойств из 28 генетически “хересных” штаммов было отобрано 5 (№ 3, 23, 109, 111 и 113), характеризующихся наличием хересных аллелей для трех локусов, способностью к поверхностному росту на сброженном виноградном сусле и образованию альдегидов в процессе выдержки.

Апробация штаммов дрожжей в условиях микроиноделия. Отобранные в лабораторных условиях штаммы № 3, 23, 109, 111 и 113 были испытаны в условиях микроиноделия. Проводили контроль выбраживания сахаров, начала роста пленки и момента полного покрытия ею поверхности сброженного сусла. На данном этапе штамм № 109 был снят с эксперимента из-за появления при брожении сусла посторонних тонов. Показатели скорости поверхностного роста у штаммов оказались близкими (табл. 4). Так, начало поверхностного роста дрожжей с момента окончания брожения составило в среднем 10 сут, а полное зарастание поверхности сброженного сусла — 10–13 сут. По пленкообразующей способности опытные штаммы были близки к контрольному, за исключением штамма № 113, сформировавшего пленку на 7 сут позднее. По химическому составу и органолепти-

Таблица 5. Химический состав виноматериалов биологически выдержанного сброженного сусла в условиях микровиноделия сезона виноделия 2019 г.

№ штамма	Объемная доля этилового спирта, %	Концентрация			Дегустационная оценка, балл	Соответствие типу
		титруемых кислот, г\л	летучих кислот, г\л	альдегидов, мг\л		
3	11.4	5.9	0.5	492	7.8	Соответствует
23	11.7	5.8	0.5	768	7.7	Соответствует
111	11.7	5.7	0.5	817	7.6	Соответствует
113	11.6	6.2	0.7	693	7.7	Соответствует
I-329 (контр.)	11.7	5.7	0.5	838	7.8	Соответствует

ческой оценке виноматериалы, выдержанные под пленкой, отвечали требованиям, предъявляемым к биологически выдержанным виноматериалам (табл. 5).

В дальнейшем пленки с поверхности сброженного виноградного сусла были использованы в качестве посевного материала на поверхность виноматериала, сброженного винными дрожжами. Такой способ инокуляции предусматривается технологией производства вина типа Херес пленочным способом. У всех 4 штаммов подтвердилась способность к пленкообразованию и в таких условиях (табл. 4).

С учетом энологических исследований в условиях микровиноделия сезона 2019 г. из 5 штаммов два (№ 3 и 23) были отнесены к наиболее перспективным для дальнейшей производственной селекции. Таким образом, подход, основанный на первичном отборе штаммов, имеющих генетические маркеры “хересных” дрожжей, с последующим изучением их энологических свойств, можно предложить в качестве перспективного при селекции новых штаммов хересных дрожжей для совершенствовании технологии производства вина типа Херес.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-16-00109).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саенко Н.Ф., Козуб Г.И., Авербух Б.Я., Шур И.М. Вино херес и технология его производства. Кишинев: Картия Молдавенияскэ, 1975. 160 с.
2. Alexandre H. // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 167. № 2. P. 269–275.
3. Legras J.-L., Moreno-Garcia J., Zara S., Zara G., Garcia-Martinez T., Mauricio J.C., Mannazzu I., Coi A.L., Bou Zeidan M., Dequin S., Moreno J., Budroni M. // Front. Microbiol. 2016. V. 14. № 7. P. 503.
4. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 428 с.
5. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. The Yeasts: a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 2010. 178 p.
6. Наумова Е.С., Иванникова Ю.В., Наумов Г.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 656–661.
7. Кишковская С.А., Эльдаров М.А., Думина М.В., Танащук Т.Н., Равин Н.В., Марданов А.В. // Прикл. биохимия и микробиология, 2017. Т. 53. № 3. С. 323–332.
8. Legras J.-L., Galeote V., Bigey F., Camarasa C., Marsit S., Nidelet T., Sanchez I., Couloux A., Guy J., Franco-Duarte R., Marcet-Houben M., Gabaldon T., Schuller D., Sampaio J.P., Dequin S. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 7. P. 1712–1727.
9. Eldarov M.A., Beletsky A.V., Tanashchuk T.N., Kishkovskaya S.A., Ravin N.V., Mardanov A.V. // Front. Microbiol. 2018. V. 15. № 9. P. 965.
10. Дикань А.П., Вильчинский В.Ф., Верновский Э.А., Заяц И.Я. Виноградарство Крыма / Ред. А.П. Диканя. Симферополь: “Бизнес-Информ, 2001. 405 с.
11. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида, 2003. 560 с.
12. Suárez Valles B., Pando Bedriñana R., Lastra Queipo A., Mangas Alonso J.J. // Food Microbiol. 2008. V. 25. № 5. P. 690–697.
13. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 221 с.
14. Charpentier C., Colin A., Alais A., Legras J.L. // Anton. Leeuw. Int. J. G. 2009. V. 95. № 3. P. 263–273.
15. Fidalgo M., Barrales R.R., Ibeas J.I., Jimenez J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006. V. 103. № 30. P. 11228–11233.
16. Strobe P.K., Skelly D.A., Kozmin S.G., Mahadevan G., Stone E.A., Magwene P.M., Dietrich F.S., McCusker J.H. // Genome Res. 2015. V. 25. № 5. P. 762–774.
17. Codón A.C., Gasent-Ramírez J.M., Benítez T. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 2. P. 630–638.
18. König H., Uden G., Fröhlich J. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Luxembourg: Springer Science & Business Media, 2009. 522 p.
19. Borneman A.R., Forgan A.H., Kolouchova R., Fraser J.A., Schmidt S.A. // G3 (Bethesda). 2016. V. 7. № 6(4). P. 957–971.
20. Martínez P., Pérez Rodríguez L., Benítez T. // Am. J. Enol. Vitic., 1997. V. 48. № 1. P. 55–62.
21. Verstrepen K.J., Klis F.M. // Mol. Microbiol. 2006. V. 60. № 1. P. 5–15.
22. Giudici P., Zambonelli C., Kunkee R.E. // Am. J. Enol. Vitic., 1993. V. 44. № 1. P. 17–21.
23. Huang C.W., Walker M.E., Fedrizzi B., Gardner R.C., Jiranek V. // FEMS Yeast Res. 2017. V. 17. № 6.

Natural Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts, Promising for Production of Sherry-Like Wines

S. A. Kishkovskaya^a, T. N. Tanashchuk^a, M. Yu. Shalamitskiy^a, V. I. Zagoryiko^a, M. I. Shiryaev^b,
D. A. Avdanina^b, M. A. Eldarov^b, N. V. Ravin^b, and A. V. Mardanov^{b,*}

^aFederal State Institution of Science Russian National Research Institute Viticulture and Winemaking "Magarach" RAS,
Republic of Crimea, Yalta, 298600 Russia

^bInstitute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

A methodological approach to identification of natural flor strains of *S. cerevisiae*, promising for production of sherry-like wines is presented. This approach is based on the initial selection of strains using genetic markers and subsequent study of their enological properties. Ninety six strains of *S. cerevisiae* were isolated from grape samples. The IST1 spacer allele specific for wine strains was found in 82 strains and 14 strains carried the allele characteristic of French flor strains. Specific alleles characteristic of Spanish sherry yeast strains was not found. A deletion of 111 bp in the promoter of the FLO11 adhesin gene, typical for flor strains, was detected in 11 strains, and a flor yeast specific allele of the *YDR379C-A* gene was detected in 20 strains. In total, 28 strains carried a flor yeast allele for at least one of the three loci. 21 of these strains formed a flor on the surface of the fermented grape must. Based on the results of genetic research and assessment of oenological properties, 5 strains characterized by the presence of flor yeast specific alleles for three loci and capable of flor formation were selected. Testing the strains in winemaking allowed us to recommend 2 strains as the most promising for further selection.

Keywords: sherry yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, ITS, *Flo11*, genotyping, physiological and biochemical properties, flor formation, aldehyde formation

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА ОСВЕЩЕНИЯ НА ВЫХОД БИОМАССЫ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА ФОТОСИСТЕМЫ 2 И ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ У *Ocimum basilicum*

© 2020 г. В. С. Зотов¹, Ю. В. Большевцев¹*, С. А. Хапчаева¹, И. В. Терехова¹, В. В. Шубин¹, Н. П. Юрина¹, Ю. Н. Кульчин²

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Институт автоматики и процессов управления Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690041 Россия

*e-mail: bolychev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 02.11.2019 г.

После доработки 19.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Изучено действие света различного спектрального состава (белый-ББ, белый-красный-БК, белый – синий-БС и белый-красный-синий-БКС) на сырую массу, высоту растений, суммарную площадь поверхности листьев, параметры переменной флуоресценции фотосистемы 2 (ФС2) и содержание суммарной фракции эфирных масел у 30- и 50-суточных растений базилика, сорта “Аромат корицы”. 30-суточные растения базилика, адаптированные к свету БС, характеризовались наибольшим содержанием хлорофилла, наиболее высоким значением коэффициента фотохимического тушения флуоресценции ФС2, но наименьшей сырой массой и суммарной поверхностью листьев по сравнению растениями, выращенными на свету другого спектрального состава. Более длительная адаптация (50 сут) базилика к освещению разного спектрального состава, но при этом одинаковой интенсивности, приводила к выравниванию растений по содержанию хлорофилла и высоте. Обнаружена положительная корреляция изменений коэффициента фотохимического тушения флуоресценции ФС2 и сырой массы у 50-суточных растений. Наибольшее количество суммарной фракции эфирных масел установлено у 50-суточных растений, выращенных на свету с высокой долей красного излучения (БК и БКС), имеющих генеративные побеги с бутонами.

Ключевые слова: базилик, фитотрон, светодиодное освещение, эфирные масла

DOI: 10.31857/S0555109920030174

Рост народонаселения, изменения климата, возрастающие потребности в натуральной сельскохозяйственной продукции способствуют развитию различных искусственных систем для выращивания растений, таких как тепличные, гидропонные системы или системы вертикального сельского хозяйства [1–4]. Эти системы требуют использования недорогих и компактных источников света, каковыми являются светодиоды. Светильники, созданные на основе светодиодов, характеризуются малыми размерами, длительным временем жизни, низким потреблением электроэнергии и способностью перекрывать весь видимый диапазон оптического спектра [5]. В ряде работ показана целесообразность использования светодиодов в качестве источника, как основного, так и дополнительного освещения [4–6]. Использование светодиодов открывает новые перспективы оптимизации условий освещения для культивирования растений в искусственных систе-

мах. Для развития этих технологий необходимы знания о разнообразных биохимических, биофизических и физиологических ответах на качество света и связанных с ними сигнальных и метаболических путях. Свет, в первую очередь, воздействует на фотосинтетический аппарат растений. Для оценки состояния фотосинтетического аппарата широко используется флуоресценция хлорофилла ФС2 [7, 8]. Измерение флуоресценции хлорофилла является быстрым, не инвазивным, не деструктивным методом скрининга состояния растений.

Известно, что спектральный состав света влияет как на фотосинтетические характеристики, так и морфогенез растений [2, 9]. Исследования, проведенные на разных видах растений и сортах одного вида, показали, что примерно одинаковый спектральный состав освещения может вызывать неодинаковые изменения фотосинтетических и морфологических параметров не только у

Таблица 1. Интенсивность излучения ($\text{мкмоль м}^{-2} \text{с}^{-1}$), примененная при различных условиях освещения базилика. Показано распределение интенсивности фотонного потока по спектральным диапазонам фотосинтетически активной радиации (ФАР) и инфракрасного излучения (ИК)

Условия освещения растений	Интенсивность излучения, $\text{мкмоль м}^{-2} \text{сек}^{-1}$				
	ФАР (400–720 нм)				ИК (700–800 нм)
	суммарная интенсивность	синий (400–500 нм)	зеленый (500–600 нм)	красный (600–700 нм)	
ББ	115.3 (100%)	23.3 (20.2%)	52.8 (45.8%)	39.2 (34.0%)	3.6
БК	117.3 (100%)	11.7 (10.0%)	27.6 (23.5%)	78 (66.5%)	2.8
БС	115.4 (100%)	67 (58.1%)	27.6 (23.9%)	20.8 (18.0%)	1.7
БКС	125.5 (100%)	29.5 (23.5%)	23 (18.3%)	73 (58.2%)	2.3

разных видов растений, но и сортов одного вида [2, 3], поэтому необходимы более широкие исследования видо- и сортоспецифических ответов растений на различный спектральный состав освещения. Кроме того, мало изучено влияние спектрального состава света на содержание соединений вторичного метаболизма — эфирных масел.

В связи с этим в качестве модельного объекта был выбран базилик (*Ocimum basilicum*), который используют в медицине и пищевой промышленности благодаря эфирным маслам, содержащим производные фенолов и монотерпенов [10]. В настоящей работе были исследованы фотосинтетические и морфологические параметры базилика, выращенного при белом освещении (4000 К) с дополнением света синих (пик — 460 нм) и (или) красных (пик — 660 нм) светодиодов.

Цель работы — изучение воздействия различных соотношений дополнительного красного и синего излучения к основному белому свету на общее содержание эфирных масел, флуоресценцию хлорофилла ФС2 и морфологические параметры, отражающие рост и развитие растений базилика раннеспелого сорта “Аромат корицы” (сырая масса, высота, суммарная площадь поверхности листьев), а также подбор оптимального режима статического светодиодного освещения для достижения максимальных сортовых показателей зеленой биомассы и/или общего содержания эфирного масла в растениях.

МЕТОДИКА

Растения и условия выращивания. Вегетационный опыт на растениях базилика (*Ocimum basilicum*), сорта “Аромат корицы” (Агрофирма “АЭЛИТА”, Россия) проводили в сосудах на 0.5 л с почвой (грунт универсальный, ООО “Фаско+”, Россия) в трех повторностях в условиях фитотрона (“Альготеконсорциум”, Россия) с поддержанием температурного режима (день — 27°C, ночь — 23°C), фотопериода (14-часовой световой день) и задан-

ными спектральными характеристиками освещения светодиодами: с доминантой в синей зоне спектра (БС), зеленой (ББ) и красной (БК и БКС) (табл. 1). Цикл вегетации равнялся 30 и 50 сут. Плотность фотосинтетически активной радиации (излучение в диапазоне 400–720 нм — ФАР) определяли при помощи поверенного спектрофотометра ТКА-Спектр (ФАР) (“ТКА”, Россия). В табл. 1 представлено распределение интенсивности фотосинтетически активной радиации (ФАР) при различных условиях освещения.

Для исследования параметров флуоресценции и содержания хлорофилла использовали листья 3 яруса у 30- и 50-суточных растений базилика. Измерения фотосинтетических параметров проводили в 2–3 повторностях для каждого из трех растений, выращенных при одинаковом освещении. На всех рисунках приведены средние арифметические значения параметров. Статистическую обработку проводили в программе ORIGIN 6.0 с критическим уровнем значимости $p \leq 0.05$. Уточнения даны в подписях к рисункам.

Индукция и релаксация флуоресценции ФС2. Индукцию и релаксацию флуоресценции ФС2 листьев базилика регистрировали при помощи флуорометра PAM-101 (“Walz”, Германия) [11]. При измерении индукции флуоресценции в качестве источника действующего света (680 нм, 420 $\text{мкмоль м}^{-2} \text{с}^{-1}$, 3 мин) использовали галогеновую лампу KL 1500 (“Schott”, Германия) с интерференционным фильтром BPF-680 (“Фотоптик”, Россия) и тепловым фильтром (“Balzers”, Лихтенштейн). Для измерения максимального выхода флуоресценции ФС2 (F_m) использовали насыщающий белый свет (1 с, 3000 $\text{мкмоль м}^{-2} \text{с}^{-1}$). На рис. 1 представлена характерная кривая индукции и релаксации флуоресценции базилика, выращенного при освещении БС светом.

Концентрация хлорофилла. Концентрацию хлорофилла определяли в 80%-ных ацетоновых экстрактах листьев растений по методу Лихтен-талера [12].

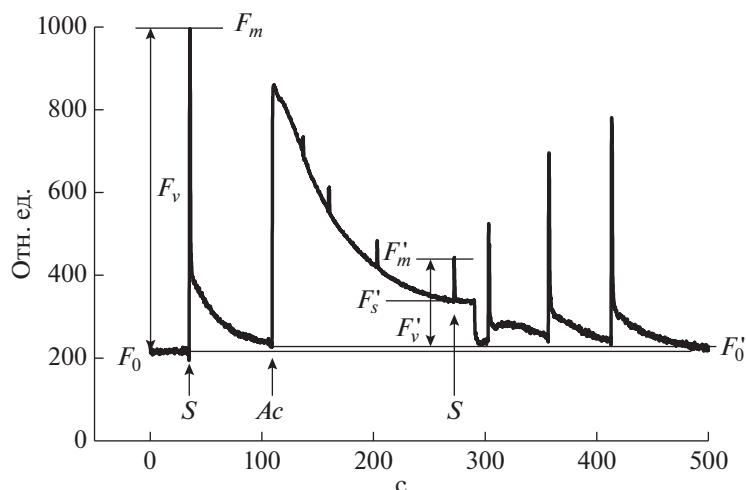


Рис. 1. Характерная кривая индукции и релаксации флуоресценции (отн. ед.) листа 30-суточного базилика, адаптированного к БС-свету. F_v/F_m — максимальная квантовая эффективность ФС2 (после темноты); $(F'_m - F'_s)/(F'_m - F'_0)$ — коэффициент фотохимического тушения (F_q'/F'_v), нелинейно связан с долей центров ФС2, которые открыты (Q_A окислен); $(F_v - F'_v)/F_v$ — коэффициент нефотохимического тушения (NPQ). Стрелками указано время включения насыщающего ($S - 1$ с) и действующего ($Ac - 3$ мин) света.

Площадь листьев определяли весовым методом.

Определение содержания эфирного масла методом газожидкостной хроматографии. Для оценки содержания компонентов эфирного масла базилика в трех повторностях отбирали равные количества усредненной биомассы листьев целого растения, отдельно для 30- и 50-суточных культур. Образцы экстрагировали смесью метанол : бензол : гексан в равных объемах при соотношении образцов : экстракционная смесь 1 : 2 (вес : об.). Экстракцию проводили не менее 12 ч при температуре 4°C. Затем жидкую часть отфильтровывали и добавляли равный объем дистиллированной воды. После полного разделения фаз, верхнюю фазу отбирали и исследовали методом газожидкостной хроматографии. Исследования проводили на хроматографе Shimadzu GC 2010 Plus с квадрупольным масс детектором GCMS-QP2010 Ultra (Япония). Режим хроматографа: газ-носитель — гелий, линейная скорость потока 36.5 см/с, деление потока 1 : 10. Температурный режим: термостат 600°C, изотерма 2 мин, далее 5°C/мин до 12°C, 10°C/мин до 150°C и 30°C/мин до 300°C, затем изотермальный 2 мин. Температура инжектора 180°C, интерфейса 205°C, детектора 200°C. Диапазон регистрации масс от 29 до 400 m/z . Идентификацию пиков проводили с использованием библиотеки масс спектров NIST 11.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено сравнительное исследование морфологических характеристик (высота растений,

суммарная площадь поверхности листьев, сырая масса), содержания хлорофилла, показателей флуоресценции ФС2 (F_v/F_m , F_q'/F'_v и NPQ) и содержания суммарной фракции эфирных масел у растений базилика сорта “Аромат корицы”, выращенных в течение 30 и 50 сут при светодиодном освещении различного спектрального состава.

Содержание хлорофиллов а и b и отношение хлорофиллов а/b у 30- и 50-суточных растений базилика. Наибольшее содержание хлорофилла а и высокое значение отношения а/b обнаружено у 30-суточных растений базилика, освещаемых светом с максимальной долей излучения в синей области спектра (БС) — 58% (рис. 2а).

Хлорофилл b у высших растений связан с большим светособирающим а/б комплексом, ассоциированным с ФС2, тогда как фотосистема 1 (ФС1) содержит хлорофилл а [13, 14], поэтому можно предположить, что в фотосинтетических мембранах 30-суточных растений базилика стехиометрическое соотношение фотосистем смещено в пользу ФС1.

Растения, выращенные при освещении светом с более низкой долей излучения в синей области спектра (ББ — 20.3%, БК — 11.7%, БКС — 23.5%), содержали меньшее количество хлорофилла и характеризовались более низким отношением хлорофиллов а/b (рис. 2а). Для 50-суточных растений базилика было характерно примерно одинаковое содержание хлорофилла (рис. 2б) при всех вариантах освещения. Поскольку все варианты спектрально различающегося освещения были выров-

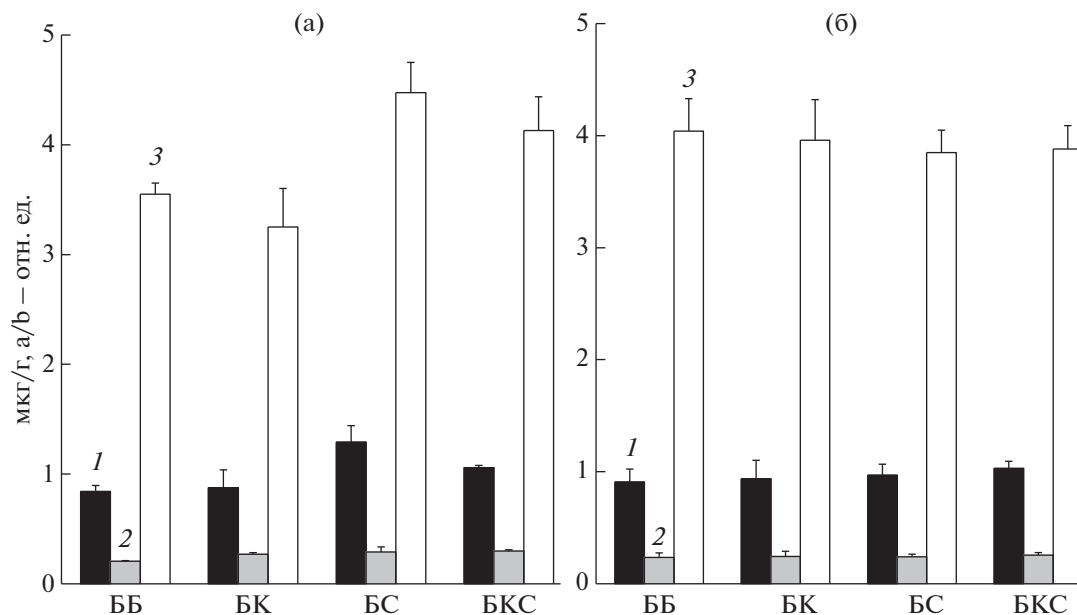


Рис. 2 Содержание хлорофилла (мкг/г сырой массы) и отношение хлорофиллов а/б (отн. ед.) у 30-суточных (а) и 50-суточных (б) растений базилика, выращенных при освещении ББ, БК, БС или БКС светом: 1 – хлорофилл а, 2 – хлорофилл б, 3 – а/б. Доверительные интервалы ($p \leq 0.05$) представляют стандартное отклонение от среднего арифметического ($\pm$ sd) для $n = 6$.

нены по интенсивности фотосинтетически активного излучения (см. Методику), то длительная адаптация растений к одинаковой интенсивности освещения, по-видимому, привела к выравниванию содержания хлорофилла и соотношения хлорофиллов а/б у 50-суточных растений, что могло отражать и выравнивание растений по соотношению фотосистем.

Параметры флуоресценции хлорофилла ФС2 у 30- и 50-суточных растений базилика. Для относительной оценки состояния фотосинтетического аппарата использовали такие параметры флуоресценции хлорофилла ФС2 как максимальную квантовую эффективность реакционных центров ФС2 (F_v/F_m), коэффициент фотохимического тушения флуоресценции ФС2 (F_q'/F_v' – отражает долю открытых реакционных центров ФС2, когда Q_A окислен, и возможен перенос электронов далее по электронтранспортной цепи фотосинтеза) и коэффициент нефотохимического тушения – NPQ . Нефотохимическое тушение флуоресценции ФС2 является многокомпонентным процессом, но в листьях, не подверженных стрессовым воздействиям, такое тушение связывают в основном с закислением внутритилакоидного пространства при переносе электронов по электронтранспортной цепи при освещении [8], поэтому был использован также и этот параметр для оценки состояния фотосинтетического аппарата. Судя по тому, что значения F_v/F_m при всех вариантах освещения 30-су-

точных растений приближались к 0.8 (рис. 3а), в таких условиях выращивания растений отсутствовали значительные стрессовые факторы [15].

Близкие значения F_v/F_m для всех вариантов 30-суточного базилика (рис. 3а), а также наибольшее содержание хлорофилла а и высокое отношение хлорофиллов а/б в растениях, выращенных в режиме БС освещения (рис. 2а), позволили предположить, что под действием синего света дополнительные молекулы хлорофилла а включались, главным образом, в ФС1, которая практически не содержит хлорофилл б [13, 14]. Поскольку, кроме спектральных различий освещения, все остальные условия (интенсивность освещения, содержание O_2 , CO_2 , температура, влажность) были одинаковы, можно предположить, что коэффициент фотохимического тушения F_q'/F_v' мог адекватно коррелировать с относительной скоростью ассимиляции CO_2 . При относительно одинаковой максимальной квантовой эффективности реакционных центров ФС2, коэффициенты фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции ФС2 были наибольшими у растений базилика, выращенных при БС освещении (рис. 3а). Таким образом, у растений базилика, выращенных при таком освещении, более высокие коэффициенты фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции ФС2 в сочетании с большим относительным содержанием ФС1, о чем судили по более высокому содержанию хлорофилла а и от-

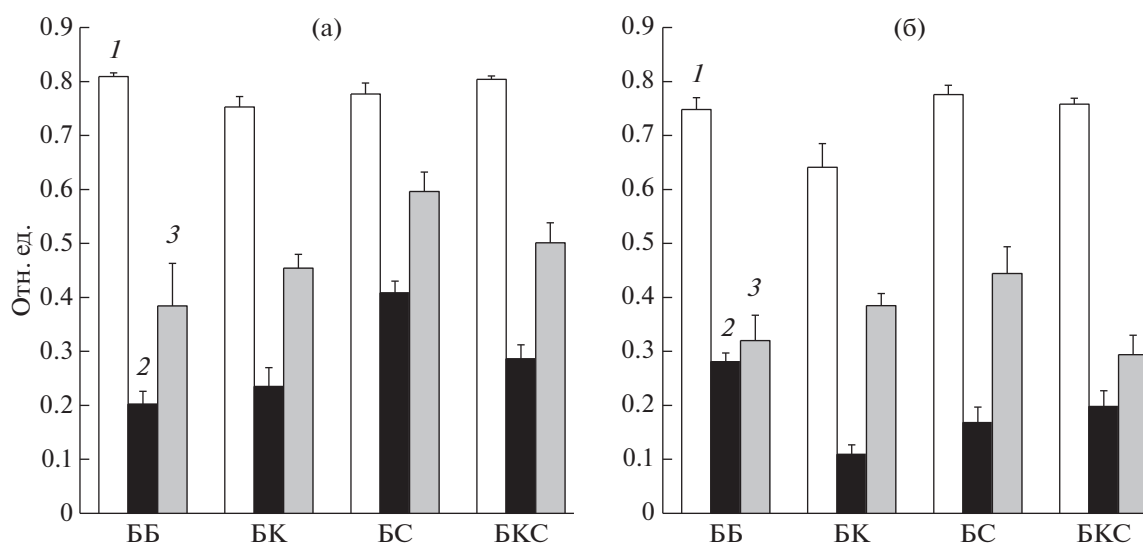


Рис. 3. Параметры флуоресценции ФС2 30- (а) и 50-суточных (б) растений (отн. ед.), выращенных при освещении разного спектрального состава: 1 – максимальная квантовая эффективность реакционных центров ФС2 (F_v/F_m), 2 – коэффициент фотохимического тушения флуоресценции ФС2 (F_q'/F_v), 3 – коэффициент нефотохимического тушения (NPQ). Доверительные интервалы ($p \leq 0.05$) представляют стандартное отклонение ($\pm sd$) для $n = 9$.

ношению хл а/б (рис. 2а), возможно, отражают повышенную активность всего фотосинтетического аппарата.

Результаты настоящей работы согласуются с полученными ранее данными на других растениях. Так, было показано, что растения перца, выращенные под люминесцентными лампами синего света, накапливали больше суммарного хлорофилла (мг/дм^{-2} площади листа) и характеризовались большей скоростью ассимиляции CO_2 по сравнению с растениями, выращенными под люминесцентными лампами красного, зеленого или белого света [1]. В проростках огурцов суммарное содержание хлорофилла в расчете на единицу площади листа, скорость ассимиляции CO_2 и устьичная проводимость также возрастали при добавлении синего излучения к основному освещению, использованному при выращивании растений [3]. Эти данные объяснялись тем, что на синем свете число клеток и хлоропластов в 1 см^2 листа было значительно больше, чем на красном или зеленом свете [16]. Удельная масса листьев (масса в расчете на единицу площади) огурца также возрастала при добавлении синего излучения к основному освещению [3].

Относительная фотохимическая активность фотосинтетического аппарата у 50-суточных растений базилика снижалась при комбинированном освещении (БК, БС и БКС), но только при освещении белым светом увеличился коэффициент фотохимического тушения и несколько снизился NPQ (рис. 3б).

Полученные результаты могли быть следствием длительной адаптации растений к освещению разного спектрального состава. У растений, освещаемых БКС светом, значения параметров флуоресценции хлорофилла ФС2, хотя и оказались близкими к таковым у растений, выращенных на белом свете, но все же были несколько ниже (рис. 3б), что, вероятно, связано с избытком излучения в красной области спектра (БКС – 58.2% и ББ – 34.0%). Возможно, что и недостаток излучения в зеленой области спектра (БКС – 18.3% по сравнению с белым – 45.8%) мог косвенно повлиять на фотохимические характеристики ФС2, так как у растений предполагается существование нескольких фоторегуляторных систем, активируемых излучением в зеленой (500–600 нм) области спектра [17]. Более низкий коэффициент фотохимического тушения и более высокий NPQ у растений, освещаемых БК светом, по сравнению с параметрами адаптированных к белому свету растений, отражают меньшую эффективность утилизации поглощенной хлорофиллами световой энергии. Это могло происходить из-за дисбаланса активации фотосистем при освещении светом, несбалансированного спектрального состава (избытка “красных” фотонов – 66.5%, и низкой доли “синих” фотонов – 11.7%), о чем можно судить по более низкому квантовому выходу ФС2 (F_v/F_m). Более низкое значение параметра F_v/F_m может отражать инактивацию некоторой части центров ФС2 из-за фотоингибирования, то есть поглощенная световая энергия не расходуется в фотохимических процессах и не высвечивается в виде флуоресцен-

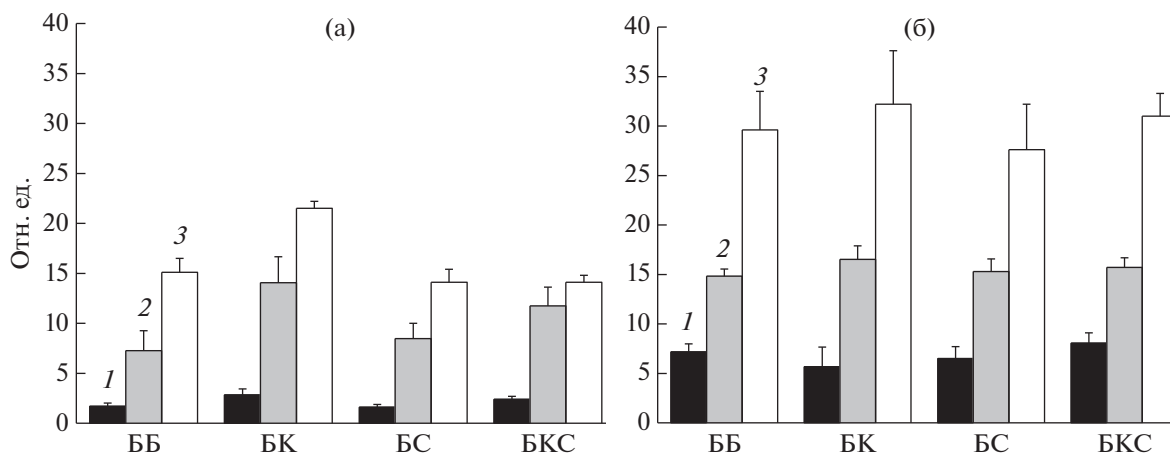


Рис. 4. Морфологические параметры 30- (а) и 50-суточных (б) растений базилика, выращенных при освещении светом разного спектрального состава: 1 — сырая масса (г), 2 — суммарная площадь поверхности листьев ($\text{см}^{-2} \times 10$), 3 — высота ($\text{см} \times 10$) растений. Доверительные интервалы ($p \leq 0.05$) представляют стандартное отклонение ($\pm \text{sd}$) для $n = 3$.

ции, но диссипирует в виде тепла [8]. Кроме того, длительная адаптация к БК освещению с низкой долей “синих” фотонов могла приводить к снижению устьичной проводимости, числа клеток и хлоропластов на единицу площади листа [1, 3]. 50-суточные растения, выращенные при освещении БС светом, обнаруживали более низкие значения коэффициента фотохимического тушения и высокое значение *NPQ*, по сравнению с растениями, адаптированными к белому свету, что может отражать низкую долю “красных” фотонов (600–700 нм) видимого излучения (18%), поглощаемых основными светособирающими пигментами растений — хлорофиллами а и b.

Таким образом, изменение параметров флуоресценции ФС2 после 50-суточной адаптации растений базилика к свету одинаковой интенсивности и различного спектрального состава, по-видимому, в основном не связано с изменением стехиометрии фотосистем, о чем судили по отсутствию значительных изменений в содержании и соотношении хлорофиллов а/б (рис. 26). Наблюдаемые изменения скорее отражают комплексную адаптацию фотосинтетического аппарата к свету различного спектрального состава (изменение устьичной проводимости, структуры хлоропластов, настройки скорости переноса электронов по электротранспортной цепи фотосинтеза и скорости темновых реакций и т.д.).

Морфологические параметры 30- и 50-суточных растений базилика. Несмотря на более высокую фотосинтетическую активность, 30-суточный базилик, выращенный с дополнительным освещением синими светодиодами (рис. 3а), характеризовался более низкими значениями морфологических параметров (сырой массой, высотой растений и суммарной площадью листьев), тогда

как наибольшие значения этих морфологических параметров обнаруживали растения, выращенные при БК освещении (рис. 4а).

Эти данные свидетельствуют о том, что более высокий уровень фотосинтеза, наблюдаемый на синем свету, не мог компенсировать дефицит площади листьев и сырой массы растений. Ранее отмечалось, что синий свет вызывал торможение роста стебля и площади поверхности листьев у растений перца [1] и проростков огурца [3]. Эти изменения объяснялись тем, что на синем свету в листьях образуется значительно большее количество ингибиторов роста (абсцизовой кислоты, оксикоричных кислот и др.) по сравнению с растениями, выращенными на красном и на зеленом свету, что приводило к формированию укороченных стеблей и более толстых листьев [1]. Вероятно, описанные выше морфофизиологические изменения растений вызваны каскадом реакций, который запускается криптохромами — фоторецепторами, активируемыми синим светом [17, 18]. Растения, адаптированные в течение 30 сут к комбинированному БК свету, накапливали большую сырую массу, были выше и отличались большей суммарной площадью поверхности листьев (рис. 4а), что может объясняться большей активацией системы фитохромов при освещении с большей долей (БК — 66%) красного излучения [1, 3], по сравнению с другими (ББ — 34.0%, БКС — 58.2% и БС — 18%) вариантами освещения.

При всех вариантах освещения 50-суточные растения базилика показали увеличение сырой массы, высоты растений и суммарной площади поверхности листьев по сравнению с 30-суточными (рис. 4б). При этом значения морфологических показателей у 50-суточных дневных растений,

адаптированных к свету разного спектрального состава (рис. 4б), заметно выровнялись, по сравнению с таковыми 30-суточных (рис. 4а). Большую сырую зеленую массу набрали растения, выращенные на БКС и белом свету, что, вероятно, связано с воздействием красного света (см. Методику) через систему фитохромов на накопление сырой массы растений [1, 2]. Большая сырая масса у растений, выращенных на БКС и белом свету, коррелировала с большими значениями коэффициента фотохимического тушения и относительно невысокими значениями коэффициента NPQ (рис. 4б, 3б). Наименьшей сырой массой характеризовались растения, выращенные при БК освещении, для которых было характерно самое низкое значение коэффициента фотохимического тушения и высокий NPQ (рис. 4б, 3б). По-видимому, при длительной 50-суточной адаптации растений к БК освещению дисбаланс между большей долей красного излучения (66.5%) и низкой долей синего излучения (11.7%) мог приводить не только к дисбалансу функционирования фотосистем (рис. 3б). Возможно, длительная 50-дневная адаптация к низкой доле “синих” фотонов приводила к таким морфофизиологическим изменениям, как снижение числа хлоропластов в расчете на единицу площади листа, удельной массы листа и др. [1, 3], которые нивелировали эффекты от активации фитохромной системы красным излучением, хотя такую активацию можно было наблюдать у 30-дневных растений при этом же освещении (наибольшие сырая масса, суммарная площадь поверхности листьев и высота, рис. 4а). Более низкая сырая масса у растений, выращенных при БС освещении, по сравнению с массой растений, адаптированных к БКС и ББ свету, может объясняться недостатком красного излучения (18%) в спектре освещения растений, что связано с нарушением активации фитохромов, а также с избытком “синих” фотонов (58.1%), которые активируют фоторецепторы синего света, в результате чего запускается каскад реакций, увеличивающий количество ингибиторов роста растения [1]. Обнаруженная положительная корреляция изменений коэффициента фотохимического тушения флуоресценции $ФС2$ и сырой массы при 50-дневной адаптации базилика к освещению различного спектрального состава (рис. 3б и 4б) указывала на то, что измеренные в настоящей работе параметры флуоресценции $ФС2$ адекватно отражали эффективность функционирования фотосинтетического аппарата при освещении различного спектрального состава.

Известно, что спектральный состав света может влиять на содержание эфирных масел (включая фенольные соединения) в растениях и, в частности, в базилике [2, 4]. Однако изучение содержания эфирных масел у растений, находящихся на разных фенологических стадиях в условиях

адаптации к стационарному освещению разного спектрального состава, не проводилось. В связи с этим исследовали влияние освещения различного спектрального состава на общее содержание суммарной фракции эфирного масла в растениях базилика.

Суммарное содержание эфирных масел в 30- и 50-суточных растениях базилика сорта “Аромат корицы”, выращенных при освещении светом разного спектрального состава. У 30-суточных растений базилика наибольшее содержание суммарной фракции эфирных масел было при адаптации растений к белому свету (рис. 5а). Ранее было показано, что при освещении базилика в течение 28 дней светодиодами различного спектрального состава, наибольшим содержанием суммарных фенольных соединений (входят в состав эфирных масел базилика [2, 10]) характеризовались растения, адаптированные к “сине-зеленому” свету (суммарно 59%) с 5%-ной долей дальнего красного излучения [2]. В настоящей работе в составе белого светодиодного освещения также была высокая доля сине-зеленого (суммарно 66%) излучения, а интенсивность дальнего красного излучения составляла $3.6 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (см. Методику). Таким образом, полученные результаты согласуются с полученными ранее данными на других сортах базилика. В результате дальнейшей адаптации (20 дней) базилика “Аромат корицы” к свету различного спектрального состава у растений при БК и БКС освещении появлялись генеративные побеги и бутоны. По-видимому, высокая доля красного излучения (при данном фотопериоде, см. Методику) через систему фитохромов способствовала зацветанию растений [19–21]. Некоторые зарубежные и отечественные авторы отмечали активацию биосинтеза соединений вторичного метаболизма (в том числе и летучих соединений) при цветении растений [21–23]. В нашем случае именно у растений с бутонами возросло содержание суммарной фракции эфирных масел как в расчете на г сырой массы, так и в пересчете на целое растение (рис. 5б).

Таким образом, для накопления эфирных масел в не цветущих растениях базилика сорта “Аромат корицы” наиболее подходящим оказалось белое светодиодное освещение с высокой долей сине-зеленого и наибольшей (в нашем эксперименте) долей дальнего красного излучения. Однако свет с высокой долей красного излучения способствовал более быстрому образованию генеративных побегов и бутонов, что, вероятно, и приводило к 4-кратному увеличению содержания суммарной фракции эфирных масел в пересчете на одно растение. Результаты согласуются с представлениями о том, что красный свет воздействует на накопление соединений вторичного метаболизма в растениях через систему фитохромов [4]. По данным ряда авторов ответы растений на

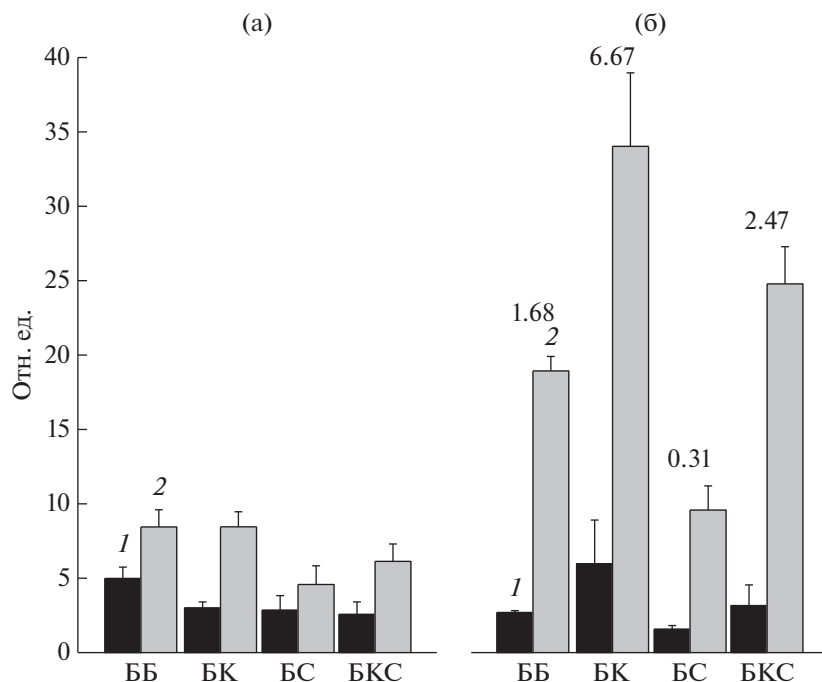


Рис. 5. Суммарное содержание эфирных масел у 30- (а) и 50-суточных (б) растений базилика, выращенных при освещении светом разного спектрального состава: 1 – содержание суммарной фракции эфирных масел (мкг/г); 2 – содержание суммарной фракции эфирных масел (мкг) на одно растение. Цифры (б) показывают отношение доли красного излучения к доле синего. Доверительные интервалы ($p \leq 0.05$) представляют стандартное отклонение ($\pm$ sd) для $n = 3$.

различный спектральный состав света зависят от вида растения и даже сорта растений одного вида [2, 3], поэтому для получения большего экономического эффекта требуются более широкие и детальные сравнительные исследования морфофизиологических ответов разных сортов базилика на стационарное светодиодное освещение разного спектрального состава.

Результаты исследований получены с использованием научного оборудования ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФГУ “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1696, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0229) по теме: “Разработка технологий управляемой вегетации целевых культур в условиях динамического освещения”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Протасова Н.Н. // Физиология растений. 1987. Т. 34. № 4. С. 812–822.
2. Bantis F., Ouzounis Th., Radoglou K. // Scientia Horticulturae, 2016. V. 198. P. 277–283.
3. Hernandez R., Kubota C. // Environmental and Experimental Botany. 2016. V. 121. P. 66–74.
4. Darko E., Heydarizadeh P., Schoefs B., Sabzalain M.R. // Phil. Trans. R. Soc. B. 2014. V. 369. P. 1–7.
5. Massa D.G., Kim Hyeon-H., Wheeler R.M. // Hortscience. 2008. V. 43. № 7. P. 1952–1956.
6. Samuolienė G., Brazaitytė A., Sirtautas R., Novičkovas A., Duchovskis P. // J. Food, Agriculture Environment. 2011. V. 9. № 3–4. P. 271–274.
7. Ruban A.V., Lavaud J., Rousseau B., Guglielmi G., Horton P., Etienne A.-L. // Photosynth. Research. 2004. V. 82. P. 165–175.
8. Baker N.R. // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 89–113.
9. Протасова Н.Н., Кефели В.И. // Фотосинтез и рост высших растений, их взаимосвязь и корреляции. Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982. С. 251–255.
10. Lewinsohn E., Ziv-Raz I., Dudai N., Tadmor Y., Lastochkin E., Larkov O., Chaimovitsh D., Ravid U., Putievsky E., Pichersky E., Shoham Y. // Plant Science. 2000. V. 160. P. 27–35.
11. Schreiber U., Schliwa U., and Bilger W. // Photosynth. Res. 1986. V. 10. P. 51–62.
12. Lichtenthaler H.K. // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350–382.
13. Anderson J.M. // FEBS Lett. 1980. V. 117. № 1. P. 327–331.

14. Mullet J.E., Burke J.J., Arntzen Ch.J. // Plant Physiol. 1980. V. 65. P. 814–822.
15. Björkman O., Demmig B. // Planta. 1987. V. 170. P. 489–504.
16. Карначук Р.А., Протасова Н.Н., Добровольский М.В., Ревина Т.А., Ничипорович А.А. // Физиология растений. 1987. V. 34. № 1. С. 51–59.
17. Гловацкая И.Ф. // Физиология растений. 2005. V. 52. № 6. С. 822–829.
18. Ahmad M., Grancher N., Heil M., Black R.C., Giovani B., Galland P., Lardemer D. // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 774–785.
19. Johnson E., Bradley M., Harberd N.P., Whitlam C.C. // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 141–149.
20. Bagnall D.J., King R.W., Whitlam C.C., Boylan M.T., Wagner D., Quail P.H. // Plant Physiol. 1995. V. 108. P. 1495–1503.
21. Zhou Yu, Singh B. R. // Plant Growth Regulation. 2002. V. 38. P. 165–171.
22. Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 1893–1902.
23. Ильченко Г.Н., Березкин Н.Г. // Вестник АГУ. 2013. 125. № 4. С. 52–56.

Effect of Light Quality on the Yield of Biomass, Photosystem 2 Fluorescence and Total Essential Oil Content of *Ocimum basilicum*

V. S. Zotov^a, Yu. V. Bolychevtseva^{a,*}, S. A. Khapchaeva^a, I. V. Terekhova^a,
V. V. Shubin^a, N. P. Yurina^a, and Yu. N. Kulchin^b

^aBach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bInstitution of Russian Academy of Sciences, Institute of Automation and Control Processes FEB RAS, Vladivostok, 690041 Russia

*e-mail: bolychev@inbi.ras.ru

The effect of artificial light of various spectral composition (white-BB, white-red-BK, white – blue-BS and white-red-blue-BKS) on the wet weight, plant height, total leaf surface area, variable fluorescence parameters of photosystem 2 (PS2) and the content of the total fraction of essential oils in 30- and 50-day-old basil plants “Cinnamon aroma” was investigated. 30-day-old basil plants adapted to BS light were characterized by the highest chlorophyll content, the highest value of the photochemical quenching coefficient of PS2 fluorescence, but the smallest wet weight and total leaf surface compared to plants grown in the light of another spectral composition. A longer adaptation (50 days) of the basil to the illumination of different spectral composition of the same intensity led to the alignment of plants in terms of chlorophyll content and height. A positive correlation was found between changes in the photochemical quenching coefficient of PS2 fluorescence and wet weight in 50-day-old plants. The largest amount of the total fraction of essential oils contained 50-day-old plants grown in the light with a high proportion of red radiation (BK and BKS) and having generative shoots with buds.

Keywords: basil, controlled environment device, LEDs lighting, essential oils

УДК 581.1:579.64:632.4

АРОМАТИЧЕСКИЕ КАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТОВ ЯЧМЕНЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ *Fusarium culmorum* И *Pseudomonas fluorescens*

© 2020 г. А. И. Шапошников¹, В. Ю. Шахназарова^{1, 2},
Н. А. Вишневская¹, Е. В. Бородин¹, О. К. Струнникова^{1, *}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
г. Санкт-Петербург, 196608 Россия

²Санкт-Петербургский Государственный Университет, г. Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: olgastrunnikova@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.07.2019 г.

После доработки 17.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

В корневых экссудатах стерильного ячменя, колонизированного фитопатогенным грибом *Fusarium culmorum* и антагонистической бактерией *Pseudomonas fluorescens*, методом ультраэффективной жидкостной хроматографии установлено наличие семи ароматических карбоновых кислот, известных как антимикробные вещества. В ответ на колонизацию *P. fluorescens* ячмень в экссудатах продуцировал меньшее количество антимикробных компонентов, чем при колонизации *F. culmorum*. Все продуцируемые ароматические карбоновые кислоты подавляли рост *F. culmorum*, но только две из них в самой высокой концентрации ингибировали рост *P. fluorescens*. Полученные данные свидетельствовали о способности растения, посредством корневых экссудатов создавать в ризосфере благоприятные условия для развития полезных бактерий и неблагоприятные для роста фитопатогенного гриба. Это открывает перспективы возможного отбора сортов зерновых культур, содержащих определенный состав антимикробных компонентов в корневых экссудатах.

Ключевые слова: *Fusarium culmorum*, *Pseudomonas fluorescens*, экссудаты ячменя, ароматические карбоновые кислоты, антимикробные компоненты, ингибирование роста

DOI: 10.31857/S0555109920030137

Факультативный фитопатогенный гриб *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. поражает широкий набор сельскохозяйственных культур и особенно вредоносен для зерновых, приводя к недобору урожая и загрязнению зерна микотоксинами [1, 2]. Влияние хозяйского растения на колонизирующую способность *F. culmorum* и его развитие в ризосфере изучено очень слабо. Между тем известно, что растения, помимо источников питания, формирующих прикорневое микробное сообщество, выделяют в ризосферу вещества, обладающие антимикробными свойствами [3]. Так, экссудация антимикробных веществ корнями *Arabidopsis thaliana* обеспечивала устойчивость растений к нескольким не хозяйским бактериальным патогенам. Однако хозяйский штамм *Pseudomonas syringae*, патогенный для *A. thaliana*, был устойчив к антимикробным компонентам экссудатов [4]. Кофейная кислота экссудатов томата подавляла рост патогенной бактерии *Ralstonia solanacearum* [5]. Антимикробное вещество скополетин, входящее в состав корневых экссудатов *A. thaliana*, ин-

гибировало рост фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *Verticillium dahliae*, обитающих в почве, в то время как ризобактерия *P. simiae* WCS417 была устойчива к нему [6]. Содержащиеся в корневых экссудатах ячменя ароматические карбоновые кислоты (*нара*-кумаровая, ванилиновая, 4-гидроксифенилуксусная, феруловая, *транс*-коричная, бензойная и сиреневая) ингибировали рост фитопатогенного гриба *F. graminearum* [7]. В настоящее время присутствие антимикробных компонентов в корневых экссудатах рассматривают как одну из стратегий защиты против фитопатогенных микроорганизмов, созданную растением. Было установлено, что антимикробные компоненты экссудатов, выделяемые растением в ризосферу, способны оказывать не только прямое воздействие на фитопатогены, подавляя их рост, но и опосредованное через влияние на прикорневое микробное сообщество, изменение в составе которого становится благоприятным для развития полезных для растений микроорганизмов [5, 6, 8].

В данной работе было оценено влияние ароматических карбоновых кислот на рост патогена ячменя *F. culmorum* и антагонистической бактерии *P. fluorescens*. В предыдущей работе [9] было показано, что бактерия подавляла рост гриба в почве. При этом оказалось, что на корнях ячменя плотность грибного мицелия в присутствии бактерии была снижена не во всех случаях, но, несмотря на это, внесение *P. fluorescens* 2137 совместно с *F. culmorum* в почву или в вермикулит всегда приводило к снижению интенсивности корневой гнили ячменя [10–12]. Выяснение характера ответной реакции растения на колонизацию фитопатогенным грибом и его антагонистом позволит получить новые данные о роли самого растения в защите от инфицирования фитопатогенным грибом и в регуляции взаимоотношений в ризосфере и ризоплане ячменя.

Цель работы — определение количественного состава ароматических карбоновых кислот (антимикробных веществ) в корневых экссудатах ячменя в ответ на его колонизацию *F. culmorum* и *P. fluorescens*, и оценка воздействия антимикробных веществ на рост этих микроорганизмов.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе был использован восприимчивый к фузариозной корневой гнили ячмень *Hordeum vulgare* L. сорта Белогорский из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова.

F. culmorum штамм 30 был выделен из пораженных корней ячменя. Изолят был идентифицирован по морфологическим признакам [13]. Использование видо-специфичных праймеров OPT18 F/R подтвердило принадлежность изолята к виду *F. culmorum* [14]. Гриб выращивали на агаризованной среде Чапека в течение 14 сут. Макрокониции смывали стерильной водой, осаждали центрифугированием (2000 g, 10 мин) и доводили до нужной концентрации после учета количества конидий в камере Горяева.

P. fluorescens 2137 был выделен из почвы и идентифицирован методом BIOLOG [15]. Видовая идентификация штамма была подтверждена методом секвенирования гена 16S рибосомальной РНК с помощью автоматического секвенатора SEQTM-8000 (“Beckman”, США) по стандартным методикам, применяемым в ФГБНУ ВНИИСХМ. Штамм *P. fluorescens* 2137 выращивали в течение сут на МПА. Клетки суспендировали в стерильной дистиллированной воде и осаждали центрифугированием (8000 g, 10 мин). Концентрацию бактериальных клеток определяли по оптической плотности при 600 нм (OD_{600}) на спектрофото-

метре Ultrospec II (“LKB biochrom”, Швеция). Окончательное количество жизнеспособных клеток было определено посевом бактериальной суспензии на МПА.

Получение корневых экссудатов ячменя. Эксперимент проводили в стерильном вермикулите в герметичных стеклянных сосудах емкостью 0.5 л, содержащих по 24 г сухого вермикулита, в который в одном случае внесли суспензию макрокониций гриба (2×10^5), в другом — суспензию клеток бактерии (1.5×10^7), а в третьем — совместно клетки гриба и бактерии в тех же концентрациях. В контрольных сосудах в вермикулит внесли только воду. Общее количество воды, включая суспензии микроорганизмов, составило 250 мл на каждые 100 г сухого вермикулита. Повторность сосудов шестикратная, при совместном внесении в вермикулит гриба и бактерии количество сосудов удваивали. Семена ячменя стерилизовали в 96%-ном этиловом спирте в течение 30 сек, трижды промыли стерильной водой, а затем инкубировали в 1%-ном растворе $AgNO_3$ в течение 30 мин. После удаления азотнокислого серебра семена промывали 1%-ным раствором NaCl один раз и пять раз стерильной водой, а затем переносили в стерильные чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и выдерживали в течение 30 ч. Проклюнувшиеся семена ячменя переносили в подготовленные сосуды с вермикулитом в количестве 10 штук/сосуд. Ячмень выращивали в течение 36 ч, затем растения аккуратно извлекали, излишки вермикулита удаляли, а корни промывали стерильной водой. Далее растения переносили в заранее подготовленные герметичные сосуды со стерильной деионизированной водой, которая должна была покрывать только корни ячменя, и выдерживали 4 сут при естественном освещении. По истечении указанных сроков раствор корневых экссудатов центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Супернатант хранили в морозильной камере при $-20^\circ C$ до определения состава корневых экссудатов. Корни растений оценивали на наличие симптомов гнили и определяли их сырую массу. Количество гриба и бактерии в корнях, а также в культуральных жидкостях после их роста в деионизированной воде, определяли посевом на среду Чапека и МПА соответственно.

Определение количественного состава ароматических карбоновых кислот в экссудатах ячменя. Растворы корневых экссудатов фильтровали под вакуумом через нейлоновые фильтры Magna nylon с порами 0.45 мкм (“GE Water & Process Technologies BVBA”, Бельгия) и концентрировали до суха на ротаторном вакуумном испарителе Heidolph

Таблица 1. Утилизация ароматических карбоновых кислот *F. culmorum* и *P. fluorescens*

Ароматическая карбоновая кислот	Исходное количество, нг/мл	Количество оставшейся кислоты после 3-суточной инкубации, нг/мл	
		<i>F. culmorum</i>	<i>P. fluorescens</i>
Транс-коричная	20	5.02 ± 0.45	10.73 ± 1,15
Бензойная	250	130.73 ± 11.23	70.28 ± 6.55
Феруловая	50	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0,02
Пара-кумаровая	50	0.05 ± 0.01	1.03 ± 0.09
Сиреневая	20	9.81 ± 0.85	5.16 ± 0.51
Ванилиновая	20	0	0.52 ± 0.05
4-Гидроксифенилуксусная	500	742.14 ± 70.28	214.15 ± 22.31

Hei-VAP Precision (“Heidolph Instruments GMBH & CO KG”, Германия) при 45°C. Остаток растворяли в 0.5 мл деионизированной воды (качества Milli-Q) и хранили при –20°C. Перед хроматографическим анализом растворы фильтровали центрифугированием в микропробирках с мембранными нейлоновыми фильтрами с порами 0.2 мкм Costar® Spin-X® (“Sigma-Aldrich Int. GMBH”).

Ароматические карбоновые кислоты (АКК) в корневых экссудатах ячменя определяли ультраэффективной жидкостной хроматографией (УЭЖХ) в системе Waters ACQUITY UPLC H-class (“Waters”, США). Для анализа использовали обращенно-фазовую колонку Waters Symmetry C18 (3.5 мкм, 4.6 × 75 мм) (“Waters”, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь деионизированной воды (качества Milli-Q) и ацетонитрила (LiChrosolv, HPLC grade), в которую добавляли муравьиную кислоту до концентрации 0.1%. Хроматографическое разделение осуществляли в смеси, содержащей 95% воды в течение 1.38 мин, после чего использовали линейный градиент содержания воды от 95 до 40% в течение 8.62 мин, а затем проводили промывку колонки смесью, содержащей 95% ацетонитрила в течение 2 мин. Колонку уравнивали смесью, содержащей 95% воды, в течение 3.5 мин. Скорость потока — 1.36 мл/мин при температуре колонки 25°C. Обнаружение ароматических карбоновых кислот осуществляли с использованием диодноматричного ультрафиолетового детектора Waters eLPSA при 276 нм.

Ароматические карбоновые кислоты идентифицировали и определяли их концентрации по времени выхода пиков стандартной смеси АКК с известной концентрацией, и пиков проб корневых экссудатов, а также по совпадению их УФ-спектров (в диапазоне 210–400 нм). Запись УФ-спектров проводили на детекторе Waters eLPSA в процессе хроматографического раз-

деления. В качестве стандартов служили растворы (0.01 мг/мл в метаноле) каждого из соответствующих химически чистых соединений (“Sigma-Aldrich Int. GMBH”, США). Обработку полученных хроматограмм и спектральных данных осуществляли с помощью программного пакета Empower™ 3 (“Waters”, США).

Ароматические карбоновые кислоты в метаболических микроорганизмов определяли с помощью системы УЭЖХ аналогично методике анализа образцов корневых экссудатов. Для анализа использовали культуральные жидкости гриба и бактерии после их роста в деионизированной воде в течение 1 и 4 сут.

Для оценки влияния ароматических карбоновых кислот на рост гриба и бактерии, а также для проверки способности микроорганизмов к их утилизации использовали соответствующие химически чистые АКК (“Sigma-Aldrich Int. GMBH”, США).

Способность гриба и бактерии утилизировать ароматические карбоновые кислоты была проверена при росте микроорганизмов в питательной среде (г/л: глюкоза — 1, KH_2PO_4 — 0.4, K_2HPO_4 — 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, NH_4NO_3 — 0.2), содержащей АКК в подобранных концентрациях (таблица). Готовили 500-кратный раствор каждой кислоты и общей смеси кислот в метаноле и вносили 200 мкл в 100 мл питательной среды. Растворы инокулировали макроконидиями гриба до конечной концентрации 1.5×10^4 и клетками бактерии до оптической плотности 0.04, после чего инкубировали в течение 3 сут. Остаточное количество каждой АКК определяли в культуральной жидкости гриба и бактерии с помощью системы УЭЖХ.

Для оценки влияния ароматических карбоновых кислот на рост гриба и бактерии использовали растворенные в метаноле АКК и их смесь в исходных концентрациях (табл. 1), а также в превышающих ее в 10 и 100 раз. Для оценки влияния АКК на рост

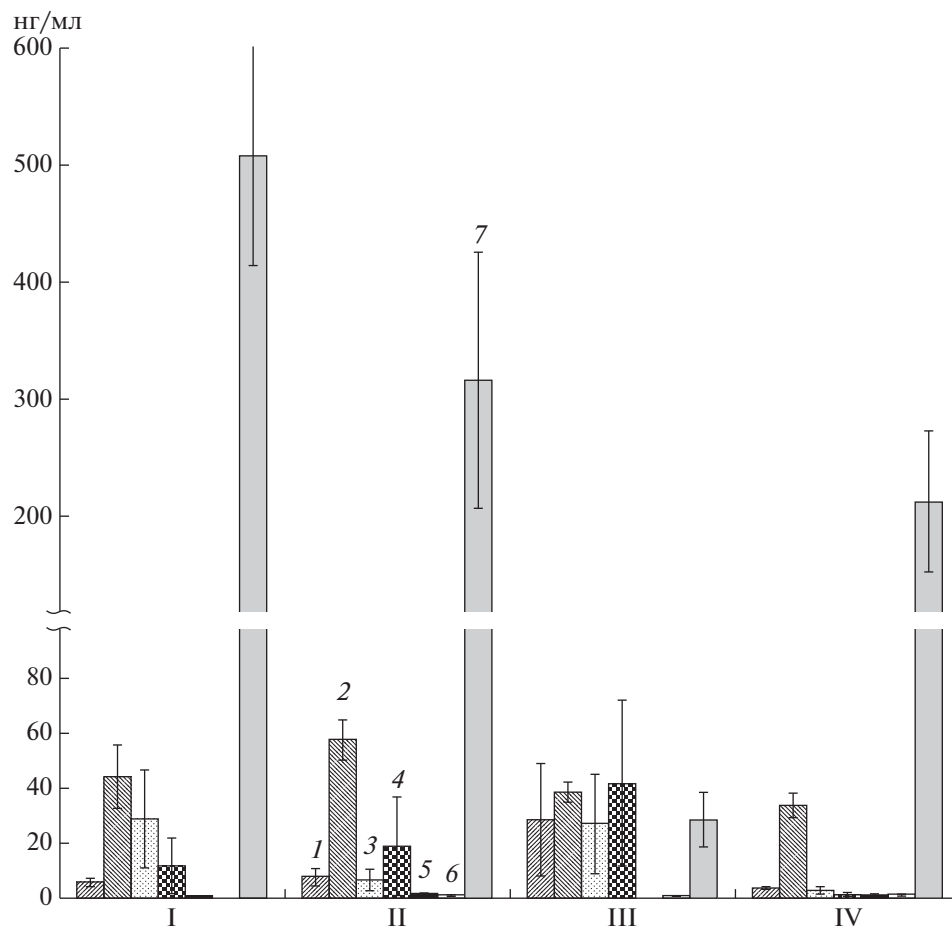


Рис. 1. Количественный состав АКК: *транс*-коричной (1), бензойной (2), феруловой (3), *пара*-кумаровой (4), сиреневой (5), ванилиновой (6) и 4-гидроксифенилуксусной (7), в 4-суточных экссудатах стерильного ячменя (I), колонизированного *F. culmorum* (II), *P. fluorescens* (III) и совместно *F. culmorum* и *P. fluorescens* (IV).

бактерии каждое из антимикробных веществ, растворенное в метаноле, и их смесь вносили в количестве 10 мкл на 5 мл среды в питательный раствор следующего состава (г/л): глюкоза — 1, KH_2PO_4 — 0.4, K_2HPO_4 — 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, NH_4NO_3 — 0.2. Растворы инокулировали смывами с МПА клетками бактерии до начальной оптической плотности 0.04 и инкубировали в течение 2 сут. Рост бактериального штамма оценивали по оптической плотности культуры при 600 нм (OD_{600}).

Для оценки влияния ароматических карбоновых кислот на рост гриба по 200 мкл растворов приготовленных кислот в трех, указанных выше, концентрациях вносили в 100 мл теплой агаризованной среды Чапека. После застывания среды в центр чашки помещали мицелием вниз блок диаметром 10 мм, вырезанный из 12-сут колонии *F. culmorum*. Измерение радиуса растущих колоний проводили на 2-е и 4-е сут.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью программы Microsoft Office Excel 2007. Эксперименты проводили в 3–6 биологических и аналитических повторностях. В качестве доверительного интервала приведены значения стандартной ошибки среднего при уровне значимости 0.05. За значимые принимали различия при значении $p < 0.05$ (на рисунках отмечены звездочкой).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ стерильных и колонизированных микроорганизмами корней не выявил симптомов гнили на тех, которые были заселены фитопатогенным грибом (данные не приведены).

В 4-суточных экссудатах ячменя было идентифицировано семь ароматических карбоновых кислот (рис. 1). Наибольшее их количество содержалось в экссудатах стерильных (контрольных)

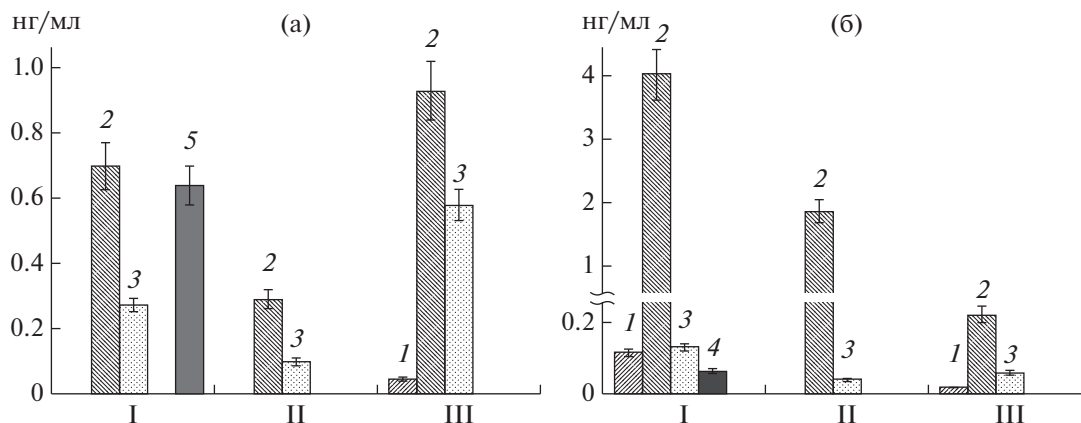


Рис. 2. Количество АКК: транс-коричной (1), бензойной (2), феруловой (3), пара-кумаровой (4), сиреневой (5), в культуральной жидкости *F. culmorum* (I), *P. fluorescens* (II) при их отдельном и совместном (III) выращивании в деионизированной воде в течение 1 (а) и 4 сут (б).

растений ячменя и колонизированных фитопатогенным грибом. Среди них доминировала 4-гидроксифенилуксусная кислота (4-ГФУ). В экссудатах ячменя, колонизированных бактерией, отсутствовала сиреневая кислота, а количество 4-ГФУ было незначительным (рис. 1).

Колонизация ячменя фитопатогенным грибом *F. culmorum* не привела к увеличению количества антимикробных компонентов в экссудатах по сравнению со стерильным ячменем. Эти данные не совпадали с данными других исследователей, которые установили увеличение по сравнению со стерильным ячменем количества антимикробных компонентов в экссудатах в ответ на колонизацию ячменя *F. graminearum* [7]. В цитируемой работе максимальное количество антимикробных веществ в экссудатах было отмечено на 7 сут после инфицирования ячменя *F. graminearum* и к этому же времени наблюдалось появление некрозов на корнях [7]. Следует отметить, что в нашем эксперименте не наблюдалось явных признаков гнили на корнях. Можно предположить, что отсутствие ответной реакции ячменя на колонизацию *F. culmorum* было связано с тем, что в заданных условиях гриб не проявлял фитопатогенную активность. Однако, количество антимикробных компонентов в экссудатах ячменя в ответ на колонизацию фитопатогенным грибом *F. culmorum* было выше, чем при колонизации антагонистической ризобактерией *P. fluorescens* 2137 (рис. 1).

Учитывая, что в растворе экссудатов ячменя, колонизированных *F. culmorum* и *P. fluorescens*, могут содержаться и метаболиты этих микроорганизмов, было оценено присутствие АКК в метаболитах гриба и бактерии после их 1 и 4 сут роста в деионизированной воде (рис. 2). Проведенный анализ показал, что количество АКК в метаболитах

микроорганизмов оказалось существенно ниже, чем в растворах экссудатов ячменя (рис. 1).

Незначительное количество АКК, обнаруженное в метаболитах гриба и бактерии (рис. 2), не могло сильно повлиять на общее их количество в экссудатах, тем более что в метаболитах доминировала бензойная кислота, а в растворе экссудатов — 4-ГФУ. Полученные данные подтверждали предположение о том, что значительная часть антимикробных веществ продуцировалась растением, тем более что самое большое количество АКК было обнаружено в корневых экссудатах стерильных растений ячменя, не колонизированных микроорганизмами (рис. 1).

В метаболитах микроорганизмов АКК появились уже на 1 сут (рис. 2а). При этом в метаболитах гриба их количество оказалось выше, чем в метаболитах бактерии (рис. 2а, 2б). К 4 сут в метаболитах гриба и бактерии, растущих отдельно, существенно увеличивалось количество бензойной кислоты, в то время как при их совместном росте общее количество АКК в метаболитах значительно снижалось по сравнению с 1 сут и прежде всего за счет бензойной и феруловой кислот. Снижение количества АКК на 4 сут в метаболитах гриба и бактерий при их совместной инкубации не могло быть связано с отсутствием роста этих микроорганизмов. Как показал проведенный анализ, количество гриба на 4 сут при совместной инкубации с бактерией оказалось даже выше, чем при культивировании гриба без бактерии (рис. 3а). Количество же бактерии при совместном росте с грибом не было ниже, чем при инкубации только бактериального штамма (рис. 3б). Снижение количества ароматических карбоновых кислот в метаболитах при совместном выращивании гриба и бактерии в воде могло быть следствием использо-

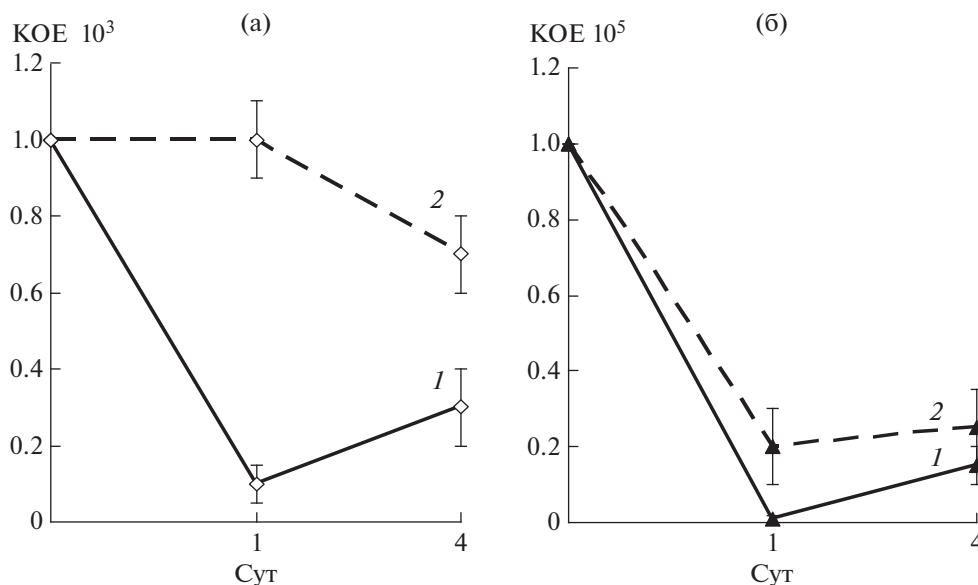


Рис. 3. Количество (КОЕ) *F. culmorum* (а) и *P. fluorescens* (б) при их раздельном (1) и совместном (2) росте в деионизированной воде в течение 4 сут.

вания этих веществ микроорганизмами в качестве источника питания. Результаты определения содержания ароматических карбоновых кислот в метаболитах *F. culmorum* и *P. fluorescens* после инкубации в течение 3 сут и их исходное количество приведены в таблице. Определение остаточных количеств АКК после выращивания в их растворах гриба и бактерии свидетельствовало, что эти микроорганизмы способны утилизировать значительную часть ароматических карбоновых кислот (табл. 1).

Способность бактерий рода *Pseudomonas* деградировать ароматические соединения хорошо известна [16–19], именно на этом основано использование псевдомонад в технологиях биоремедиации. Согласно полученным данным и фитопатогенный гриб *F. culmorum* в условиях голодания также способен использовать АКК как источник углерода для своего роста. Только 4-ГФУ не утилизировалась грибом, а ее количество в культуральной жидкости даже увеличивалось. Такое увеличение количества 4-ГФУ при утилизации грибом антимикробных веществ (табл. 1) связано, вероятнее всего, с присутствием этой кислоты в метаболитах гриба (рис. 2а). Наличие АКК в культуральной жидкости было оценено после роста гриба в воде, в то время как эксперимент по утилизации проводился в среде, содержащей необходимые для роста гриба элементы питания, что привело к увеличению плотности гриба и, соответственно, количества выделяемых им метаболитов.

Ароматические карбоновые кислоты, внесенные в питательный раствор, в той или иной степени и в разных концентрациях, оказывали влияние на рост гриба и бактерии (рис. 4). Количество используемых в данных экспериментах АКК было подобрано на основании данных по 4-суточной экссудации растений в деионизированную воду, и результатов, полученных ранее при анализе корневых экссудатов ячменя [7]. Радиальный рост гриба на среде Чапека на 4 сут подавлялся всеми исследуемыми антимикробными веществами. Наименьшее воздействие оказывали бензойная кислота, 4-ГФУ и смесь кислот, которые подавляли рост гриба только в повышенных концентрациях (рис. 4а).

На рост бактерии ароматические карбоновые кислоты оказали меньшее ингибирующее воздействие, чем на гриб (рис. 4б). Ко 2 сут рост бактериального штамма был подавлен в среде с добавлением повышенных концентраций бензойной, 4-ГФУ и смеси кислот (рис. 4б). Для проверки влияния АКК на рост гриба и бактерии использовали такое их количество, которое было обнаружено в растворе экссудатов. Однако реальное количество ароматических карбоновых кислот в близости к корню могло быть существенно выше, чем в растворе экссудатов.

Таким образом, проведенный хроматографический анализ показал, что в экссудатах ячменя количество ароматических карбоновых кислот, относящихся к антимикробным веществам, изменяется в зависимости от микроорганизма, ко-

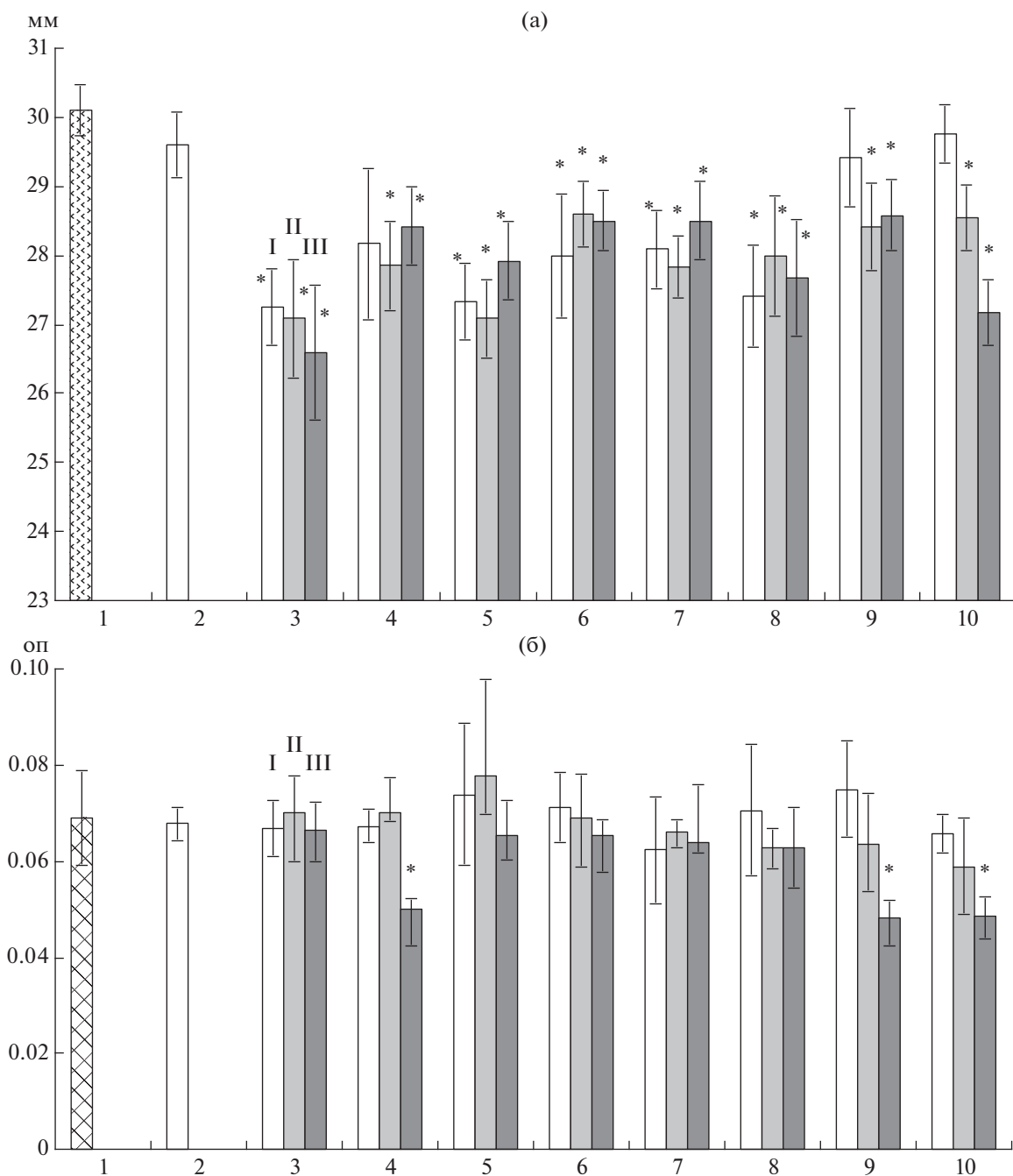


Рис. 4. Влияние метанола (2) и АКК *транс*-коричной (3), бензойной (4), феруловой (5), *пара*-кумаровой (6), сириневой (7), ванилиновой (8), 4-гидроксифенилуксусной (9) и смеси кислот (10), на рост гриба *F. culmorum* на среде Чапека (1): а — радиус 4-суточных колоний, мм; б — ОП₆₀₀ 2-суточной суспензии *P. fluorescens* (1) при выращивании в жидкой питательной среде с АКК при концентрациях: I — исходная (табл. 1), II — в 10 и III — в 100 раз превышающих исходную (существенные отличия от контроля отмечены звездочкой).

лонизирующего корня. Так, колонизация ячменя антагонистической ризобактерией сопровождалась выделением в экссудатах меньшего количества антимикробных веществ, чем колонизация фитопатогенным грибом (рис. 1). Низкое количество АКК в экссудатах ячменя, колонизирован-

ного бактерией, было обусловлено незначительным содержанием 4-ГФУ (рис. 1). Бактериальный штамм в отличие от грибного был способен утилизировать данную кислоту (табл. 1). Однако снижение количества 4-ГФУ в экссудатах ячменя могло объясняться не только утилизацией этого

вещества бактерией во время ее роста на корнях. Как показали результаты эксперимента, бактерия примерно вдвое снижала количество 4-ГФУ, присутствующей в среде (таблица), тогда как в растворе корневых экссудатов ячменя, колонизированного бактерией, ее количество было снижено в 17 раз по сравнению с количеством в экссудатах стерильного ячменя (рис. 1). Таким образом, изменение количественного состава АКК в корневых экссудатах ячменя, колонизированного бактерией, связано не столько с утилизацией этих веществ данным бактериальным штаммом, сколько с ответной реакцией самого растения.

Исходя из полученных результатов, можно сделать заключение, что *P. fluorescens* 2137 обладал большей адаптационной способностью к существованию в ризосфере и ризоплане ячменя, чем *F. culmorum*. В ответ на колонизацию ризобактерией ячмень отвечал меньшим количеством антимикробных компонентов в экссудатах, чем на колонизацию фитопатогенным грибом. Бактериальный штамм оказался и более устойчивым к антимикробным веществам экссудатов, чем фитопатогенный гриб. Полученные данные свидетельствовали о том, что растение ячменя, выделяя антимикробные вещества в ризосферу, создавало более благоприятные условия для развития *P. fluorescens* и менее благоприятные — для развития *F. culmorum*. Можно предположить, что снижение плотности гриба на корнях в присутствии бактерии, описанное в предыдущих работах [10–12], могло быть связано не только с прямым действием бактерии, но и с влиянием растения.

Таким образом, в перспективе возможен отбор сортов зерновых культур с определенным составом антимикробных компонентов в корневых экссудатах. Возделывание таких сортов позволит улучшить фитосанитарное состояние почв путем регуляции состава прикорневой микрофлоры.

Для выполнения работы использовали оборудование центра коллективного пользования “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ЦКП ГТПКБ ФГБНУ ВНИИСХМ).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-016-00111-а). Хроматографический анализ ароматических карбоновых кислот выполнен при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-16-00097).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. // Plant Pathol. 1995. V. 44. № 2. P. 207–238.

2. Clear R., Patrick S. Fusarium Head Blight in Western Canada <https://www.grainscanada.gc.ca/en/grain-research/scientific-reports/fhb-western/fhb-1.html>; (Revised), 2010.
3. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. № 3. P. 233–266.
4. Bais H.P., Prithiviraj B., Jha A.K., Ausubel F.M., Vivanco J.M. // Nature. 2005. V. 434. № 7030. P. 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature03356>
5. Gu Y., Wei Z., Wang X., Friman V.-P., Huang J., Wang X., Mei X., Xu Y., Shen Q., Jousset A. // Biol. Fertil. Soils. 2016. V. 52. № 7. P. 997–1005. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1136-2>
6. Stringlis I.A., Yu K., Feussner K., de Jonge R., Van Bentum S., Van Verk M.C., Berendsen R.L., Bakker P.A.H.M., Feussner I., Pieterse C.M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 22. P. E5213–E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>
7. Lanoue A., Burlat V., Henkes G.J., Koch I., Schurr U., Rose U.S.R. // New Phytologist. 2010. V. 185. № 2. P. 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03066.x>
8. Stringlis I.A., de Jonge R., Pieterse C.M.J. // Plant Cell Physiol. 2019. V. 60. № 7. P. 1405–1419. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz076>
9. Струнникова О.К., Шахназарова В.Ю., Вишневская Н.А., Чеботарь В.К., Тихонович И.А. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 5. С. 675–681.
10. Струнникова О.К., Шахназарова В.Ю., Вишневская Н.А., Чеботарь В.К., Тихонович И.А. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 1. С. 68–77.
11. Струнникова О.К., Феоктистова А.С., Вишневская Н.А., Чеботарь В.К. // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. № 2. С. 160–168.
12. Strunnikova O.K., Vishnevskaya N.A., Ruchiy A.S., Shakhnazarova V.Yu., Vorobyov N.I., Chebotar V.K. // Plant Soil. 2015. V. 389. № 2. P. 131–144. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2351-y>
13. Gerlach W., Nirenberg H. The Genus Fusarium — a Pictorial atlas. Mitt Berlin-Dahlem: Biol. Bundesanst Land U Forstwirtschaft, 1982. 40 p.
14. Шахназарова В.Ю., Феоктистова А.С., Чижевская Е.П., Вишневская Н.А., Струнникова О.К. // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. № 4. С. 287–292.
15. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Проворов Н.А., Тихонович И.А. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 521–525.
16. Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P.N. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 19. P. 5912–5918.
17. Muller C., Petruschka L., Cuypers H., Burchhardt G., Herrmann H. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 7. P. 2030–2036.
18. Shrivastava R., Purohit H., Phale P.S. // J. Bioremed. Biodegrad. 2011. V. 2. № 2. P. 120. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000120>
19. Karishma M., Trivedi V.D., Choudhary A., Mhatre A., Kambl P., Desai J., Phale P.S. // FEMS Microbiol. Letters. 2015. V. 362. № 20. P. 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv139>

Aromatic Carboxylic Acids in Root Exudates of Barley and Their Influence on Growth of *Fusarium culmorum* and *Pseudomonas fluorescens*

A. I. Shaposhnikov^a, V. Yu. Shakhnazarova^{a,b}, N. A. Vishnevskaya^a,
E. V. Borodina^a, and O. K. Strunnikova^{a,*}

^aAll-Russia Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia

^bSaint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: olgastrunnikova@rambler.ru

Using an ultra performance liquid chromatography system, the presence of seven aromatic carboxylic acids, known as antimicrobial substances, has been established in root exudates of barley colonized by the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* and the antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. It was established that barley produced fewer antimicrobial components in the exudates in response to the colonization of *P. fluorescens*, than after colonization by *F. culmorum*. All aromatic carboxylic acids inhibited the growth of *F. culmorum*, but only two of them inhibited the growth of *P. fluorescens*, and only in the highest concentration. The obtained data testify to the ability of the plant to create favorable conditions for the development of beneficial rhizobacteria and unfavorable for the growth of the phytopathogenic fungus via composition of root exudates. In the future, it is possible to select varieties of grain crops with a specific composition of antimicrobial components in root exudates.

Keywords: *Fusarium culmorum*, *Pseudomonas fluorescens*, barley exudates, aromatic carboxylic acids, antimicrobial components, growth inhibition

УДК 577.117/597.4

СОДЕРЖАНИЕ КАРНОЗИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ОСЕТРОВЫХ И ИХ ГИБРИДОВ

© 2020 г. М. В. Михайлова¹, В. Н. Прозоровский¹, К. В. Золотарёв¹*,
О. М. Ипатова¹, А. Н. Михайлов¹, Е. Н. Харенко², А. В. Артёмов²

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, 107140 Россия

*e-mail: fireaxe@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

В работе описан и апробирован новый чувствительный метод масс-спектрометрического определения карнозина в мышечной ткани рыб, с помощью которого впервые получены значения содержания карнозина в мышцах нескольких видов рыб семейства осетровые: русский осетр, сибирский осётр, стерлядь, а также гибридов стерляди и калуги, сибирского осетра и калуги. Гибриды стерляди и калуги, вне зависимости от пола, содержали в 3.33 раза больше карнозина ($p < 0.01$), чем стерлядь. Ткани самок гибрида сибирского осетра и калуги содержали в 1.50 раза меньше карнозина ($p < 0.1$), чем самки сибирского осетра. Поскольку потребление карнозина важно для биосинтеза собственного карнозина в мышцах человека, то по пищевой ценности гибридизация стерляди с калугой целесообразнее по сравнению с исходными видами, а скрещивание сибирского осетра с калугой менее эффективно. Измерение содержания карнозина в мышечной ткани важно для оценки их пищевой ценности.

Ключевые слова: карнозин, метод определения, русский осетр, сибирский осетр, стерлядь, калуга, гибриды осетровых

DOI: 10.31857/S0555109920030083

Карнозин (β -аланил-L-гистидин) — дипептид, состоящий из аминокислот β -аланина и гистидина, соединенных пептидной связью, вместе с производными (анзерин, баленин, гомокарнозин) образует семейство дипептидов, выполняющих одинаковые функции и представленных в скелетных мышцах и нервной системе позвоночных. Содержание данных дипептидов в других тканях пренебрежимо мало [1, 2]. В мышечной ткани основная роль карнозина и его аналогов — поддержание pH внутри клеток (буферная функция), что особенно важно при интенсивной мышечной работе, приводящей в условиях недостатка кислорода к накоплению молочной кислоты и закислению среды. Кроме буферного действия, карнозин и его аналоги являются антиоксидантами (защищают мышечную ткань при окислительном стрессе) прямого и косвенного действия. Прямое действие состоит во взаимодействии с биологическими окислителями в качестве восстановителя, косвенное — в предотвращении протонирования иона O_2^- с образованием OH-радикала (сильный окислитель) за счет буферного свойства дипептида. Карнозин также способен связывать ионы тяжелых металлов за счет образо-

вания донорно-акцепторных связей, продукты перекисного окисления липидов, является источником гистидина (предшественника гистамина). В нервной ткани карнозин является частью защитного механизма от некроза, вызываемого гомоцистеиновой кислотой [3].

Для большинства пептидаз карнозин, благодаря тому, что включает в себя остаток β -аминокислоты, недоступен. Разложение карнозина, поступающего с пищей, происходит в печени и крови, а также внутри клеток с помощью специальных ферментов — карнозинов [3]. В клетках мышечной и нервной ткани происходит биосинтез карнозина из продуктов его разложения. Таким образом, основной источник карнозина в организме — карнозин, поступающий с пищей. Изучение свойств карнозина показало, что он полезен в качестве компонента пищевого рациона, а его содержание в мясных и рыбных продуктах может характеризовать их пищевую ценность. Данные о содержании карнозина в мышечной ткани представляют научную и практическую значимость при разработке продукции функционального и специализированного назначения.

В настоящее время в мировой литературе накоплены данные по значительному количеству видов рыб [1, 2]. Однако, что касается осетровых (*Acipenseridae*), то в литературе есть только устаревшие данные о содержании карнозина в мышцах осетра без указания конкретного вида рыбы и методики определения [4].

Цель работы — получение новых данных о содержании карнозина в мышцах рыб различных видов семейства осетровых и их гибридов.

МЕТОДИКА

В данной работе исследовали следующие виды семейства осетровые: русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*), сибирский осётр ленокской популяции (*Acipenser baerii*), стерлядь (*Acipenser ruthenus*), а также полученных в искусственных условиях гибриды стерляди и калуги (*Huso dauricus*) (обозначение Ст × К), гибрида сибирского осетра ленокской популяции и калуги (ЛО × К).

Все особи исследуемых видов и гибридов выращивались в садках в естественном водоеме (Вологодская обл., р. Суда, Россия). Образцы мышечной ткани отбирали на анализ в июле. Для получения гибридов использовали икру половозрелых самок стерляди и сперму калуги, икру самок сибирского осетра и сперму калуги. Икру получали путем подрезания яйцеводов с сохранением жизни производителям. Оплодотворение проводили полусухим способом. После обесклеивания икру инкубировали в специализированных аппаратах. Молодь подращивали в стандартных пластиковых бассейнах. Подрощенную рыбу пересаживали в садки для дальнейшего выращивания.

Для анализа отбирали взрослых здоровых особей в количестве по 5 самцов и самок каждого исследуемого вида и гибрида. После изъятия рыбы из воды ее подвергали анестезии на льду. Образцы мышечной ткани (~1.0 г) отбирали со спинной и хвостовой части рыбы, замораживали до температуры -18°C и хранили в замороженном виде вплоть до определения карнозина.

Для анализа взвешивали 0.1 г замороженной ткани от каждого образца, помещали в микропробирку (эппендорф), заливали для экстракции 1.0 мл 0.1%-ного водного раствора муравьиной кислоты. Пробирки закрывали и помещали в водяную баню в пластиковом стакане для гомогенизации ультразвуком в гомогенизаторе “Bandelin Sonopuls HD 2200” (“Bandelin Electronic” GmbH & Co. KG, Германия) при мощности 95% в течение 10 мин. Из полученных гомогенатов отбирали по 0.1 мл и добавляли по 0.9 мл метанола, интенсивно встряхивали в течение 1 мин для осаждения белков, затем центрифугировали 10 мин при 6600 g. Отбирали по 0.1 мл надосадочной жидко-

сти и добавляли по 0.9 мл 0.1%-ного водного раствора муравьиной кислоты.

Определение содержания карнозина проводили на жидкостном хроматографе “Agilent 6130” (Agilent Technologies, США) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Для этого на колонку (неподвижная фаза — радикал C_{18} с полярной функциональной группой) вводилось по 10 мкл образца. Хроматографическое разделение образцов выполняли в изократическом режиме: подвижная фаза — раствор 10%-ного ацетонитрила и 0.09%-ной муравьиной кислоты в воде. Скорость элюирования 0.5 мл/мин. Карнозину соответствовал пик с отношением массы к заряду 227.3 в положительном режиме ионизации. Калибровку проводили, используя растворы карнозина с концентрацией в интервале 0.2—4.0 мг/л, содержащие 0.1% муравьиной кислоты.

Статистическую обработку полученных данных: вычисление среднего арифметического, среднеквадратичного отклонения, уровня значимости по распределению Стьюдента проводили с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение использованного метода определения карнозина (см. раздел Методика) с описанными ранее в литературе по интервалам концентраций карнозина, в которых наблюдалась хорошая линейность зависимости интенсивности сигнала от концентрации, показало, что метод наиболее чувствителен среди использующих масс-спектрометрический детектор и один из наиболее чувствительных методов среди описанных (табл. 1).

Хроматографические системы с масс-спектрометрическим детектором наиболее распространены в современной аналитической химии. Популярность данного типа систем вызвана несколькими факторами: прежде всего, многозадачность аппаратуры (любое соединение имеет массу и может ими определяться), а также относительно невысокая стоимость. В любой лаборатории хроматографическая система устанавливается не только для определения карнозина; параллельно с ним можно определять, например, аминокислоты и другие пептиды в рамках одного измерения. В связи с этим мы считаем целесообразным как сравнение данного метода с другими, где использовался масс-спектрометрический детектор, так и со всеми остальными.

Карнозин — гидрофильное соединение, поэтому в ряде опубликованных методов проводилась его дериватизация — химическая модификация вещества с целью удлинения углеродного скелета и увеличения гидрофобности, обеспечивающее большее сродство с материалами носителей или сорбентов хроматографических колонок с высокой разде-

Таблица 1. Сравнение методов определения карнозина в тканях рыб с использованием жидкостной хроматографии, опубликованных ранее и использованных в работе

Тип детектора	Пределы линейности сигнала, мг/л	Реактив для дериватизации	Источник
Масс-спектрометрический	0.2–4.0	Нет	Данная статья
УФ(диодная матрица)	32.4–388.0	2,5-диметил-1-Н-пиррол-3,4-дикарбальдегид	[6]
УФ	10–100	Нет	[7]
УФ (диодная матрица)	14–24	2,4-Динитрофторбензол	[8]
УФ (диодная матрица)	0.007–3.12	Дансилхлорид	[9]
УФ (диодная матрица)	30–110	2,4-Динитрофторбензол	[10]
Масс-спектрометрический	1–200	Нет	[11]
УФ	9.8–98	Нет	[12]
УФ (диодная матрица)	13–416	Нет	[13]
Масс-спектрометрический	2.3–56.5	Дабсилхлорид	[14]
Импульсный амперометрический	0.023–22.6	Нет	[15]

Таблица 2. Содержание карнозина в мышечной ткани осетровых и их гибридов*

Объект	Пол	Содержание карнозина, мг/г ткани	Источник
Гибрид Ст × К	♂	1.716 ± 0.305	Данная статья
Гибрид Ст × К	♀	1.416 ± 0.224	
Гибрид Ст × К (среднее по всем особям)	Смесь	1.566 ± 0.290	
Стерлядь	Смесь	0.470 ± 0.103	
Гибрид ЛО × К	♂	2.358 ± 0.359	
Гибрид ЛО × К	♀	1.454 ± 0.282	
Сибирский осетр	♀	2.176 ± 0.185	
Русский осетр	♀	2.012 ± 0.251	
Гибрид К × Ст	Нет данных	1.56	[5]
Осетр (без уточнения вида)	Нет данных	2.50	[4]

* Результаты представлены как среднее арифметическое ± среднеквадратичное отклонение.

лительной способностью. В работе использовали колонку с полярной функциональной группой, что позволяло исключить дериватизацию и упростить метод. Кроме того использование такого носителя даёт возможность одновременно измерять концентрации и других соединений сходного строения в образце, например, других дипептидов и свободных аминокислот.

Результаты определения содержания карнозина в исследуемых образцах приведены в табл. 2. Статистическая обработка данных дает возможность сделать следующие заключения.

– Не обнаружено значимых различий по содержанию карнозина в мышцах особей гибрида стерляди и калуги разного пола (интервалы значений перекрываются). Для сравнения со стерля-

дью было целесообразно использовать среднее значений разных особей данного гибрида (третья строка табл. 2).

– Сравнение содержания карнозина в мышечной ткани гибрида Ст × К и стерляди показало, что в мышцах гибрида содержалось в 3.33 раза больше карнозина (при уровне значимости $p < 0.01$ согласно распределению Стьюдента).

– Выявлены существенные различия по содержанию карнозина между особями разного пола (самцами и самками) гибрида ЛО × К: мышцы самцов содержали в 1.62 раза больше карнозина ($p < 0.05$).

– При сравнении содержания карнозина в мышцах самки гибрида ЛО × К с самкой сибирского осетра можно заключить, что в мышцах ги-

брида содержалось в 1.50 раза меньше карнозина ($p < 0.1$).

– Не было обнаружено значимых различий в содержании карнозина в тканях самок близкородственных видов осетра – русский осетр и сибирский осетр ленокской популяции (интервалы значений перекрываются).

В табл. 2 также представлены опубликованные ранее данные по другим видам и гибридам осетровых. В частности, гибрид, при получении которого использовалась икра калуги и сперма стерляди (К × Ст), содержал примерно столько же карнозина, как и рассмотренный в данной работе гибрид Ст × К, однако авторы [5] приводят данные только по одной особи гибрида К × Ст.

Если рассматривать содержание карнозина как существенный фактор пищевой ценности, то можно заключить, что гибридизация стерляди с калугой целесообразнее по сравнению с чистым родительским видом (стерлядь) по пищевой ценности мышечной ткани, а использование гибрида сибирского осетра с калугой по сравнению с осетром в технологическом аспекте является менее эффективным.

Работа выполнена в рамках “Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abe H. Histidine-related ipeptides: Distribution, Metabolism, and Physiological Function // *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, V. 4. / Eds. Hochachka and Mommsen. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995. P. 309–333.
2. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. // *Physiol Rev.* 2013. V. 93. Issue 4. P. 1803–1845.
3. Болдырев А.А. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 4. С. 403–418.
4. Boldyrev A.A., Severin S.E. // *Adv. Enzyme Regul.* 1990. V. 30. P. 175–188.
5. Давлетшина Т.А., Шульгина Л.В. // *Рыбпром*. 2010. № 1. С. 47–50.
6. Gatti R. // *Chromatographia*. 2015. V. 78. Issue 15–16. P. 1095–1099.
7. Abdelkader H., Swinden J., Pierscionek B.K., Alany R.G. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 114. P. 241–246.
8. Khalikova M.A., Satinsky D., Solich P., Zinchenko A.A., Zhilyakova E.T., Novikov O.O. // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. Issue 5. P. 1475–1481.
9. Szterk A., Roszko M. // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2014. V. 37. Issue 5. P. 664–680.
10. Gatti R., Andreatta P., Boschetti S. // *J Chromatogr A*. 2013. V. 1298. P. 95–102.
11. Peiretti P.G., Medana C., Visentin S., Giancotti V., Zunino V., Meineri G. // *Food Chem.* 2011. V. 126. Issue 4. P. 1939–1947.
12. Han M.-N., Chen X.-H., Qi Q.-G., Ji X.-Y., Bi K.-S. // *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2009. V. 44. Issue 14. P. 1111–1113.
13. Tian Y., Xie M., Wang W., Wu H., Fu Z., Lin L. // *Eur Food Res Technol.* 2007. V. 226. Issue 1–2. P. 311–314.
14. Chen Y.-H., Lin Y.-P., Liou S.-E., Chen C.-C. // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2007. V. 42. Issue 5. P. 593–600.
15. Nardiello D., Cataldi T.R.I. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1035. Issue 2. P. 285–289.

Carnosine Levels in the Muscle Tissues of Sturgeons and Their Hybrids

M. V. Mikhailova^a, V. N. Prozorovskiy^a, K. V. Zolotarev^{a,*}, O. M. Ipatova^a,
A. N. Mikhailov^a, E. N. Kharenko^b, and A. V. Artemov^b

^a*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia Россия*

^b*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia*

*e-mail: fireaxe@mail.ru

Carnosine level determination in fish muscle tissues is helpful for the purposes of general biology and comparative muscle physiology of various fish species; it may be also useful for estimating the nutritional value of fish products. A method of mass-spectrometric determination of carnosine in muscle tissues has been improved and tested in this work. The carnosine levels in the muscles of Russian sturgeon, Siberian sturgeon, sterlet, sterlet and kaluga hybrid, Siberian sturgeon and kaluga hybrid have been firstly determined using that method. The sterlet and kaluga hybrid regardless of its sex contains 3.33-fold more carnosine than the sterlet does ($p < 0.01$). The female Siberian sturgeon and kaluga hybrid contains 1.50-fold less carnosine than the female Siberian sturgeon does ($p < 0.1$). Considering the nutritional value, since carnosine consumption is important for the biosynthesis of own carnosine in human muscles, hybridization of sterlet with kaluga is more efficient than pure sterlet breeding, and the hybridization of Siberian sturgeon with kaluga is less effective when than sturgeon breeding.

Keywords: carnosine, determination method, Russian sturgeon, Siberian sturgeon, sterlet, kaluga, hybrids of sturgeons

УДК 597.552.512:577.115.3:639.37

ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ И НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ ОТ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ

© 2020 г. Н. Н. Фокина^{1, *}, Л. А. Лысенко¹, Т. Р. Руоколайнен¹,
И. В. Суховская¹, Н. П. Канцерова¹, Н. Н. Немова¹

¹Институт биологии ФИЦ “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: fokinann@gmail.com

Поступила в редакцию 04.09.2019 г.

После доработки 03.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Продукт товарного рыбоводства, скелетные мышцы рыб, является источником животного белка, фосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот, незаменимых в питании человека. Изучено влияние условий обитания рыб (сезонной динамики температуры воды и кислородного режима) и их физиологического состояния (инфекционного статуса) на липидный состав мышечной ткани у двухлетней радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, выращиваемых в садках на естественном водоеме. Установлено, что скорость ростовых процессов молоди снижалась в условиях повышенной температуры воды, наличия бактериальной инфекции и последующей антибиотикотерапии. При этом в мышцах накапливался избыток энергетических липидов (триацилглицеринов) и повышалась степень насыщенности мембранных липидов. Влияние внешних факторов и бактериальной инфекции пытались нивелировать введением в рацион рыб антиоксидантной пищевой добавки, включающей дигидрокверцетин и арабиногалактан. Показано, что у потреблявшей кормовую добавку форели состав структурных тканевых липидов и содержание ненасыщенных жирных кислот были стабильными, что указывало на более высокие потребительские свойства и сбалансированный нутриентный состав получаемого из нее продукта.

Ключевые слова: дигидрокверцетин, форель, фосфолипиды, триацилглицерины, полиненасыщенные жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0555109920030034

Радужная форель, *Oncorhynchus mykiss*, широко распространенный вид семейства лососевых, относится к традиционным объектам аквакультуры на Северо-Западе России. Метаболизм форели и темпы ее роста так же, как у всех пойкилотермных животных, в значительной степени определяются температурой среды обитания. Выростной период (июнь–сентябрь) у форели сопровождается интенсивным приростом массы и линейного размера. Осенью с понижением температуры окружающей среды интенсивность ростовых процессов снижается [1]. Сезонные метаболические перестройки у форели обусловлены как ростовыми процессами, так и воздействием абиотических факторов среды обитания (температурного, кислородного режимов и др.) [2–4]. Интенсивное культивирование форели служит причиной развития у рыб патологических процессов, вызванных, в том числе, бактериальными инфекциями, которые, в свою очередь, могут значительно отразиться на биохимических и физиологических параметрах рыб [5, 6]. Липиды и их жирнокислотные компоненты отно-

сятся к важнейшим метаболическим (энергетическим) и структурным системам организма, обеспечивающим его оптимальное функционирование в норме, в том числе, при изменении факторов среды [2, 7–9]. Состав липидов определяет качество рыбы как пищевой продукции для человека, при этом высокую пищевую ценность имеет рыбная продукция с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) n-3 семейства, которое должно превалировать над ПНЖК n-6 семейства, оцениваемого по соотношению n-3/n-6 [7, 9–12]. Изменения в липидном составе мышц рыб могут провоцироваться внешними факторами. Так, например, воздействие пониженной температуры способствует повышению уровня ненасыщенности фосфолипидов мембран, в то время как влияние повышенной температуры приводит к увеличению насыщенности липидов [8, 13]. Загрязнение среды, бактериальные, грибковые и вирусные инфекции и паразитарные инвазии также изменяют метаболизм в тканях рыб, в частности, повышают уровень свободных радикалов

и инициируют тем самым окислительную модификацию макромолекул и окислительный стресс [14]. ПНЖК в составе мембранных липидов являются одной из мишеней окислительных процессов [14], их дефицит, в конечном счете, может отразиться на физиологическом состоянии рыб и качестве в составе получаемой из нее продукции.

Биологически активные пищевые добавки широко применяются в мировой технологии аквакультуры с целью ускорения роста культивируемых рыб и повышения их устойчивости к различным стрессовым воздействиям, в том числе к бактериальным инфекциям [15]. Ранее было показано, что использование в аквакультуре антиоксидантных пищевых добавок и пребиотиков, включая аскорбиновую кислоту, витамин Е, бета-гликан и бетаин, приводит к снижению уровня стрессовых гормонов у рыб и укреплению их иммунитета [16–20].

Цель работы – изучение сезонных и индуцированных бактериальной инфекцией модификаций липидного состава мышц молоди (1+) форели, а также их сохранение при введении в рацион форели смеси дигидрокверцетина (биофлавоноида) и арабиногалактана (полисахарида), получаемых из древесины лиственницы и обладающих антиоксидантными, противовоспалительными и пребиотическими свойствами [21, 22].

МЕТОДИКА

Схема эксперимента и отбор проб. С июня по ноябрь 2017 г. на форелевом хозяйстве, расположенном на одном из озер северо-западного региона России, 36000 особей молоди форели *Onco-rhynchus mykiss* (1+) сходной массы 100 ± 2.3 г были помещены в садки с плотностью посадки 2.1 кг/м^3 . Форель получала стандартный коммерческий корм (“BioMar”, Дания) без добавок (контрольные садки) или с добавлением смеси 25 мг дигидрокверцетина и 50 мг арабиногалактана на кг корма (экспериментальные садки) в соответствии с рекомендацией производителя добавок (“Аметист”, сертификат № 396-08.17, Россия). Через 1 мес. после начала эксперимента у рыб, содержащихся в контрольных и экспериментальных садках, методами визуальной оценки и по повышенному отходу было обнаружено бактериальное заболевание, возбудителем которого по данным микробиологического анализа (заключение № 939/22 от 23.08.2017, ФГБНУ ВИЭВ, Россия) оказалась ассоциация бактерий *Pseudomonas putida* и *Cytophaga psychrophila*. В связи с этим заболевание было диагностировано как бактериальная геморрагическая септицемия. Рыбы обеих групп были подвергнуты антибактериальной терапии энрофлоксацином (25 мг/кг рыбы) в течение 6 сут. Ежедневно фиксировали температуру воды и содержание кислорода.

Образцы тканей рыб (8 особей из каждого садка) отбирали два раза в 1 мес., фиксировали в 97%-ном этаноле и хранили при 4°C до проведения биохимического анализа. Одновременно с забором проб проводили измерение размерно-весовых характеристик рыб, с помощью которых рассчитывали индекс упитанности рыбы (коэффициент Фультон, К):

$$K = \text{масса рыбы (г)} \times 100 / \text{длина (см)}^3.$$

Анализ состава липидов. Биохимический анализ липидов и их жирных кислот в мышцах форели осуществляли с использованием оборудования Центра коллективного пользования Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, Россия). Липиды из тканей форели экстрагировали смесью хлороформ : метанол (2 : 1) по методу Фолча [23]. Для разделения на основные классы, экстрагированные липиды хроматографировали на ТСХ пластине Silica gel 60 F254 (“Merck”, Германия) в системе растворителей петролейный эфир : серный эфир : уксусная кислота (90 : 10 : 1). Для идентификации полученных компонентов использовали стандартные растворы смеси фосфолипидов (“Supelco”, США) и триацилглицеринов (“Sigma-Aldrich”, США), а также растворы холестерина и пальмитата холестерина (“Sigma-Aldrich”, США). Количественное содержание основных классов липидов определяли спектрофотометрическими методами, описанными в работах [24, 25] и рассчитывали как % средних значений сухого веса $\pm$ ошибка среднего.

Содержание отдельных фракций фосфолипидов, включающих фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ) и сфингомиелин, оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе “Stayer” (“Aquilon”, Россия), используя колонку Nucleosil 100-7 (“Elsiko”, Россия) [26]. Компоненты идентифицировали по времени удерживания, сравнивая со стандартными растворами фосфолипидов: смеси фосфолипидов (P3817 “Supelco”, США), фосфатидилсерина (P7769, “Sigma-Aldrich”, США) и сфингомиелина (S7004 4, “Sigma-Aldrich”, США), и их содержание рассчитывали как % средних значений сухого веса $\pm$ ошибка среднего.

Метилловые эфиры жирных кислот общих липидов были получены с использованием метанола и хлористого ацетила, затем их разделяли ВЭГХ на газовом хроматографе “Agilent 7890A” (“Agilent Technologies”, США) с пламенно-ионизационным детектором на колонке “DB-23” (60 м – 0.25 мм) (“Agilent Technologies”, США). Компоненты идентифицировали, сравнивая время удерживания их и стандартного раствора смеси метиловых эфиров жирных кислот (“Supelco”, США). Содержа-

Таблица 1. Линейно-массовые характеристики форели (*Oncorhynchus mykiss*) контрольной и экспериментальной групп, определяющие длину (см), массу (г) и коэффициент упитанности рыбы

Дата сбора	25.06 (1)	14.07 (2)	26.07 (3)	12.08(4)	28.08(5)	12.09(6)	16.11(7)
Масса, г							
Контроль	100.0 ± 2.3	143.3 ± 8.7	187.3 ± 12.9	235.3 ± 29.3	324.8 ± 36.1	478.3 ± 46.5	702.3 ± 41.2
Эксперимент	100.0 ± 2.3	134.8 ± 5.4	185.1 ± 10.8	283.3 ± 14.9	378.9 ± 22.8	527.1 ± 16.5	743.1 ± 53.5
Длина, см							
Контроль	20.7 ± 0.4	21.1 ± 0.9	22.9 ± 1.3	22.6 ± 3.3	25.6 ± 3.1	28.4 ± 2.7	32.9 ± 1.7
Эксперимент	20.6 ± 0.4	20.9 ± 1.2	22.4 ± 1.2	25.6 ± 1.1*	26.8 ± 1.1	30.7 ± 1.4	33.6 ± 2.7
Коэффициент упитанности							
Контроль	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.3	1.9 ± 0.2
Эксперимент	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1

* Различия достоверны по сравнению с контролем, $p \leq 0.05$.

ние рассчитывали как % суммы средних значений жирных кислот ± ошибка среднего.

Статистическая обработка. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Естественную сезонную динамику параметров окружающей среды в течение периода наблюдений с июня по ноябрь 2017 г. и поражение рыб спорадической бактериальной инфекцией в июле можно было считать двумя факторами, которые в равной степени воздействовали на рыб обеих выборок, при этом вызываемые ими эффекты не могли быть достоверно разделены. Вместе с тем обнаруженные различия по выживаемости, скорости ростовых процессов и модификациям липидного состава мышц у форели, выращенной на стандартных и обогащенных биоактивной добавкой кормах, позволили судить не только о преимуществах использования этой добавки, но и в определенной мере о механизмах ее действия.

Физиологический статус форели. На протяжении исследуемого сезона (июнь–ноябрь 2017 г.) температура воды в садках изменялась в диапазоне 5.0–15.8°C с максимумом в августе, при этом содержание кислорода сохранялось на стабильно высоком уровне и составляло 7–10 мг/л. Естественное изменение температур в 2017 г. не превышало пороговых значений толерантности форели к температурному фактору и не провоцировало явлений гипоксии у изучаемого поголовья рыб. Вместе с тем на физиологическом статусе форели существенно сказалось перенесенное бактериальное заболевание. Его признаки, включая повышенную смертность, поведенческие отклонения (плавание на боку и отказ от корма) и изменения в состоянии внутренних органов (цвета, формы и тургора печени и наличие кровоизлияний в ее капсуле), наблюдались с середины июля. При максимуме бактериальной геморрагической септицемии величина отхода составила 4.0% среди рыб, выращиваемых на стандартной диете, и 1.7% — на экспериментальной. Различие в уровне смертности сохранилось между контрольной и опытной группами до конца сезона, составив 4.19 и 1.97% соответственно, что указывало на иммуномодулирующее действие добавки, благодаря которому получавшая ее рыба оказалась устойчивее к действию инфекции.

Показатели живой массы и длины форели стабильно возрастали в обеих группах на протяжении выростного сезона с максимальной скоростью роста в июле и закономерным ее снижением при сезонном понижении температуры воды (табл. 1). Индекс упитанности отражал пропорциональный линейный и весовой прирост форели обеих исследуемых групп. Тенденция к более высокой скорости роста у рыб, получавших кормовую добавку, достигла статистической значимости в августе в период излечения бактериального заболевания. Вероятно, это свидетельствовало о сокращении срока восстановительного периода у экспериментальной выборки.

Модификации липидного состава. Известно, что в мышцах лососевых рыб накапливаются липиды [11, 27, 28]. В мышцах форели обеих исследуемых групп отмечалось сезонное (с июля по август) накопление общих липидов (рис. 1), главным образом за счет высокоэнергетических липидов — триацилглицеринов (ТАГ). Значительное снижение уровня мембранных липидов — общих фосфолипидов (ФЛ) и их основных фракций (ФХ, ФЭА, ФС и ЛФХ), более выраженное у контрольной группы рыб, отмечалось к середине августа (рис. 1, 12 августа). Можно предположить, что снижение связано с активацией перекисных процессов, вызванных бактериальной инфекцией и, возможно, введением антибиотика. Показано, что на ранней стадии бактериального заболевания липидный состав мышц молоди форели существенно не изменялся, за исключением повышенного содержания минорных специфических (бактериального происхождения) насыщенных жирных

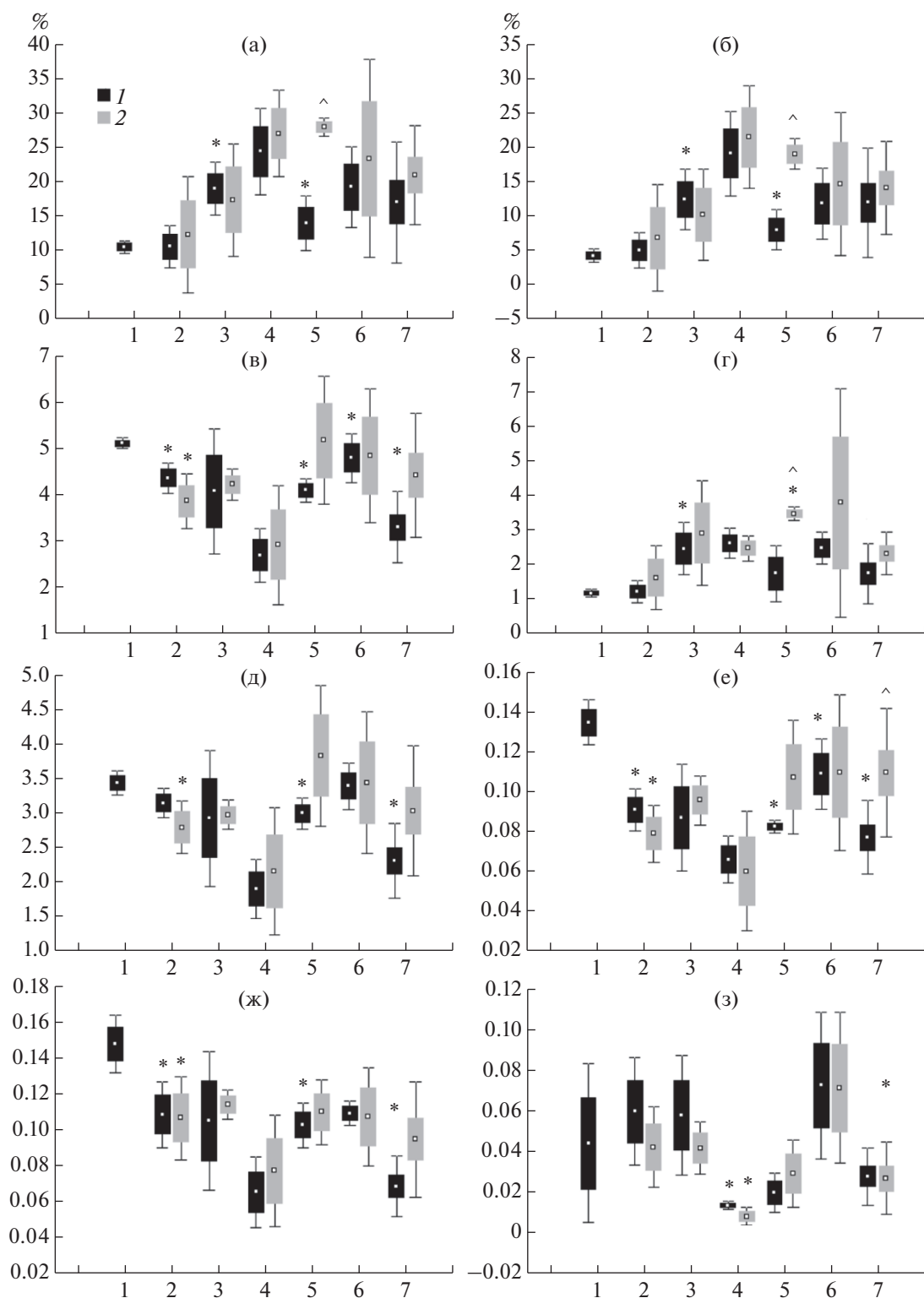


Рис. 1. Содержание (% от сухой массы) общих липидов (а), триацилглицеринов (б), фосфолипидов (в), стеридов (г), фосфатидилхолина (д), фосфатидилэтаноламина (е), фосфатидилсерина (ж) и лизофосфатидилхолина (з) в мышцах радужной форели *O. mykiss* контрольной (1) и экспериментальной (2) групп: по оси абсцисс – 1–7 даты сбора, как в табл. 1 (^ – отличия достоверны при сравнении контрольной и экспериментальной группы рыб внутри одной временной точки сбора, * – внутри одной группы рыб при сравнении с предыдущей временной точкой сбора).

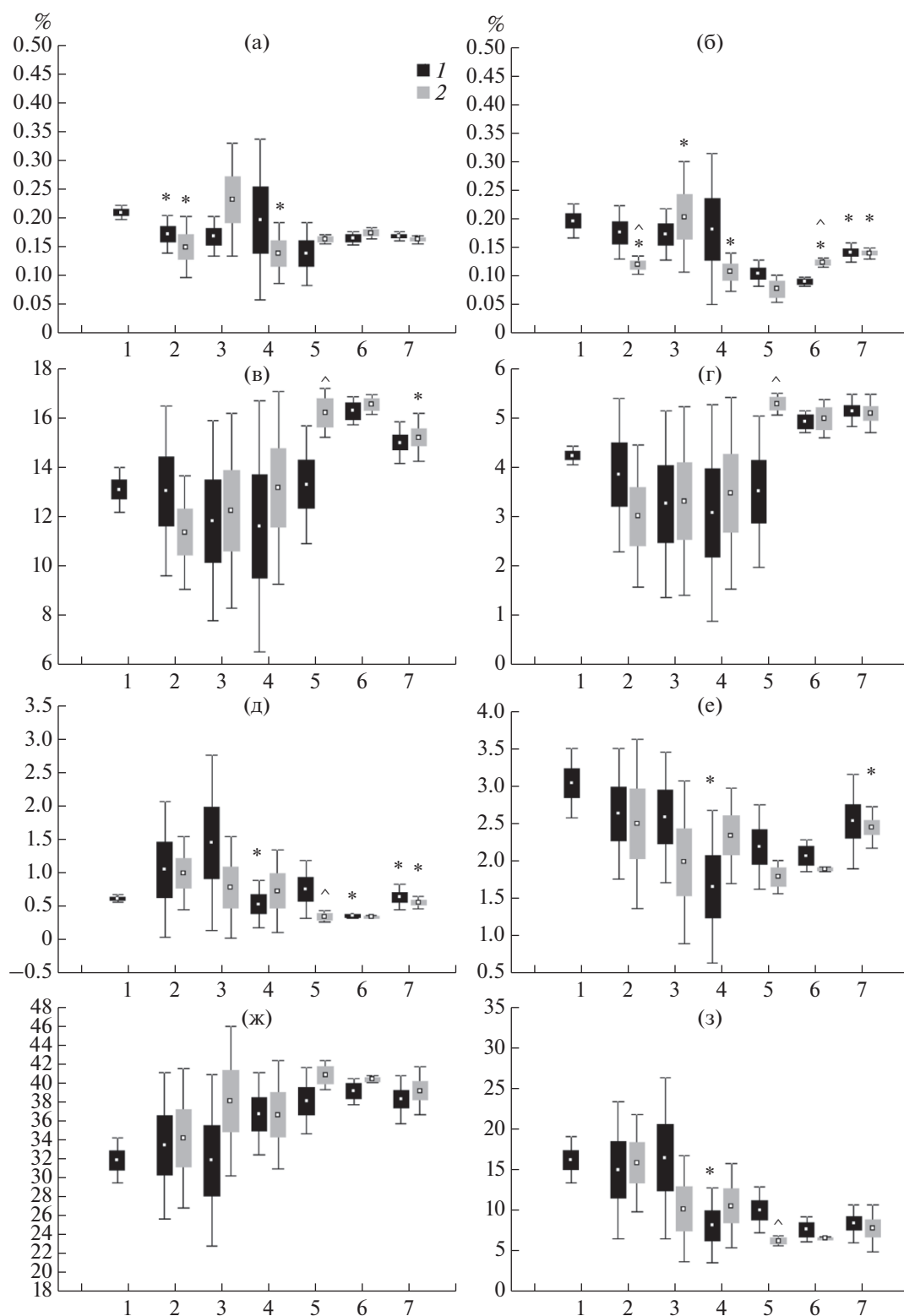


Рис. 2. Содержание жирных кислот (% от суммы) общих липидов 15:0 (а), 17:0 (б), 18:2n-6 (в), 18:3n-3 (г), 20:4n-6 (АК, д), 20:5n-3 (ЭПК, е), 18:1n-9 (ж) и 22:6n-3 (ДГК, з) в мышцах радужной форели *O. mykiss* контрольной (1) и экспериментальной (2): по оси абсцисс – 1–7 даты сбора, как в табл. 1; (^ – отличия достоверны при сравнении контрольной и экспериментальной группы рыб внутри одной временной точки сбора, * – внутри одной группы рыб при сравнении с предыдущей временной точкой сбора).

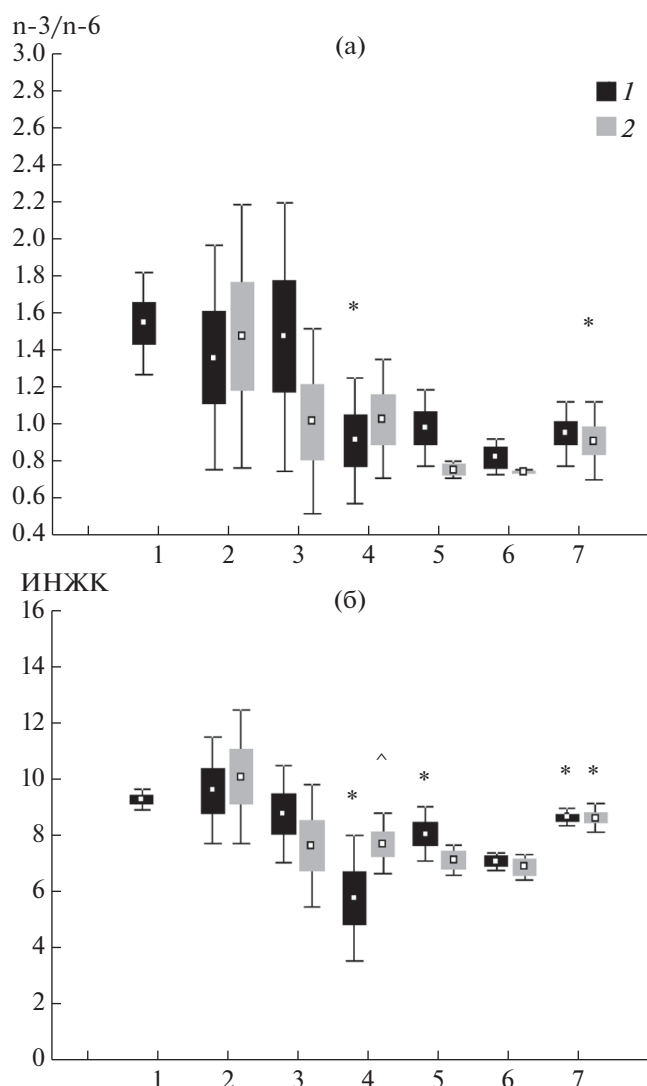


Рис. 3. Соотношение $n-3/n-6$ полиненасыщенных жирных кислот (а) и индекс ненасыщенности (ИИЖК) жирных кислот (б) общих липидов мышц радужной форели *O. mykiss* контрольной (1) и экспериментальной (2): по оси абсцисс – 1–7 даты сбора, как в табл. 1 (^ – отличия достоверны при сравнении контрольной и экспериментальной группы рыб внутри одной временной точки сбора, * – внутри одной группы рыб с предыдущей временной точкой сбора).

кислот с нечетным числом атомов углерода (15:0 и 17:0), отмеченного в органах рыб уже в июне-июле (рис. 2). Содержание данных кислот значительно снизилось к середине августа после курса антибиотикотерапии, а у экспериментальной группы рыб – и в более короткий промежуток времени.

Одновременно со снижением уровня ФЛ, отмеченного после перенесенной инфекции, в мышцах форели обнаружено снижение уровня ненасыщенности общих липидов (индекс ненасыщенности, ИИ), преимущественно за счет арахидоновой (АК), эйкозапентаеновой (ЭПК) и до-

козагексаеновой (ДГК) кислот (рис. 2 и 3, точка 12 августа). Отмечалось также снижение соотношения $n-3/n-6$ ПНЖК, которое рассчитывали как средние значения $\pm$ ошибка среднего (рис. 3, 12 августа). Можно предположить, что такие модификации в составе липидов являлись результатом оксидативных процессов, вызванных кумулятивным действием инфекционных агентов и антибиотика. Ранее было показано, что антибиотик энрофлоксацин активирует (главным образом, на 3 сут введения) процессы оксидативного стресса, которые сопровождаются изменением активности антиоксидантных ферментов и повышением уровня продуктов перекисного окисления липидов [5, 6]. Необходимо отметить, что модификация жирнокислотного состава липидов в сторону снижения уровня их ненасыщенности была характерна исключительно для контрольной группы рыб. Молодь форели, которая получала с кормом экспериментальную добавку, характеризовалась относительно стабильным составом липидов при действии бактериальной инфекции и последующей терапии антибиотиком. В этом случае компонент добавки дигидрокверцетин, вероятно, проявлял свои антиоксидантные свойства, предотвращая окисление липидов и жирных кислот, инициируемое действием бактерий и антибиотика.

У контрольной группы рыб к концу августа отмечалось восстановление уровня ФЛ за счет расходования мышечных резервов ТАГ, содержание которых снизилось (рис. 1, 28 августа). На этом сроке в мышцах форели контрольной группы отмечался пониженный по сравнению с экспериментальной группой уровень ТАГ и стерина. Можно предположить, что активация пластического обмена вследствие подавления активности бактерий с помощью антибиотика способствовала активному росту рыб, и в дальнейшем (сентябрь) наблюдалось повышение уровня структурных липидов – ФЛ. Необходимо отметить, что у экспериментальной группы рыб уже к концу августа было обнаружено повышение уровня эссенциальных жирных кислот, линолевой 18:2 $n-6$ и альфа-линоленовой 18:3 $n-3$, которое вызывалось более легким перенесением инфекционного процесса и более коротким периодом восстановления после него. Указанные жирные кислоты служат предшественниками для синтеза ПНЖК – АК и ЭПК соответственно [7, 9], которые участвуют в синтезе биологически активных молекул – эйкозаноидов, ответственных за протекание воспалительных процессов [29, 30]. Блокирование синтеза АК и ЭПК у экспериментальной группы рыб свидетельствовало о меньшей интенсивности оксидативных процессов в их органах, провоцируемых антибактериальной терапией.

К концу выростного сезона у молоди форели обеих групп отмечалось снижение уровня ФЛ

(ФХ, ФЭА, ФС и ЛФХ), что, по-видимому, связано со снижением у них интенсивности ростовых процессов в ответ на понижение температуры окружающей среды (рис. 1, точка 16 ноября). При этом важной особенностью липидного состава мышц молоди форели оказалось повышение соотношения фосфатидилэтаноламин/фосфатидилхолин в составе фосфолипидов мембран, а также уровня ненасыщенности липидов за счет накопления полиненасыщенных жирных кислот (АК, ЭПК и ДГК). Выявленные модификации в составе мембранных липидов мышц форели отражали температурные перестройки в составе липидов мембран [8, 13]. При этом у рыб экспериментальной группы наблюдалось в большей степени повышение соотношения $n-3/n-6$ ПНЖК за счет накопления физиологически активной ЭПК.

Таким образом, наблюдаемые изменения ростовых показателей и состава липидов молоди форели отражали не только воздействие абиотических факторов (главным образом, температуры), но и влияние бактериальной инфекции и последующей антибиотикотерапии. Наиболее подверженными влиянию неблагоприятных факторов оказались рыбы контрольной группы, у которых изменения состава структурных липидов и ненасыщенных жирных кислот были более выраженными. Экспериментальная группа форели отличалась относительно стабильным составом липидов мышц, как в период заболевания, так и в период химиотерапии, что свидетельствовало об их повышенной устойчивости к действию бактериальной инфекции и антибиотиков. У рыб, получавших экспериментальную диету, более быстрое восстановление процессов накопления липидов в мышцах и роста в целом, в том числе за счет синтеза биологически активных жирных кислот, указывало также на возможную физиологическую роль биоактивной добавки.

С точки зрения пищевой ценности продукции рыбоводства, полученные результаты свидетельствовали об ухудшении потребительских качеств рыбного сырья в сезон высоких температур и при распространении в поголовье инфекционных заболеваний, которые не только служили причиной повышенного отхода рыб и снижения скорости индивидуального прироста, и, как следствие, убытков рыбного производства, но и изменяли качественный состав скелетных мышц рыб. В то же время липидный состав продукции, полученной из форели, выращенной с использованием биодобавки, оказался более сбалансированным. Он характеризовался меньшей общей жирностью (оцениваемой по содержанию общих липидов и ТАГ) и, как следствие, калорийностью, и, вместе с тем, более высоким содержанием фосфолипидов, обогащенных эссенциальными полиненасыщенными жирными кислотами, получаемыми человеком преимущественно из рыбной продукции.

Авторы выражают благодарность О.Н. Кремневу за организацию работы на форелевом хозяйстве, Е.А. Завьяловой и А.Е. Дрошневу (ФГБНУ ВИАВ, Москва) за вирусологический и бактериологический анализ материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20098).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тумарев Е.Ф.* Холодноводное форелевое хозяйство. Рыбное: "Астраханский гос. технический ун-т", Дмитровский филиал, 2007. 279 с.
2. *Сидоров В.С.* Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука, 1983. 240 с.
3. *Cordiner S., Egginton S.* // *Fish Physiol. Biochem.* 1997. V. 16. № 4. P. 333–343.
4. *Thibault M., Blier P.U., Guderley H.* // *Fish Physiol. Biochem.* 1997. V. 16. № 2. P. 139–155.
5. *Tu H.T., Silvestre F., Bernard A., Douny C., Phuong N.T., Tao C.T., Kestemont P.* // *Aquac.* 2008. V. 285. № 1–4. P. 244–248.
6. *Sehonova P., Tokanova N., Hodkovicova N., Kroupova H.K., Tumova J., Blahova J., Chloupek P.* // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2019. V. 67. P. 87–93.
7. *Bell M.V., Henderson R.J., Sargent J.R.* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1986. V. 83. № 4. P. 711–719.
8. *Hochachka P.W., Somero G.N.* *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution.* Oxford: Oxford University Press, 2002. 480 p.
9. *Tocher D.R.* // *Aquac. Res.* 2010. V. 41. № 5. P. 717–732.
10. *Sushchik N.N., Gladyshev M.I., Kalachova G.S.* // *Food Chem.* 2007. V. 104. № 4. P. 1353–1358.
11. *Vegusdal A., Østbye T.K., Tran T.N., Gjoen T., Ruyter B.* // *Lipids.* 2004. V. 39. № 7. P. 649–658.
12. *Гладышев М.И.* // *Журн. СВУ.* 2012. № 5. С. 352–386.
13. *Hazel J.R., Williams E.E.* // *Prog. Lipid Res.* 1990. V. 29. № 3. P. 167–227.
14. *Lesser M.P.* // *Annu. Rev. Physiol.* 2006. V. 68. P. 253–278.
15. *Blazer V.S.* // *Annu. Rev. Fish Dis.* 1992. V. 2. P. 309–323.
16. *Dabrowski K., Lee K.J., Guz L., Verlhac V., Gabaudan J.* // *Aquac.* 2004. V. 233. № 1–4. P. 383–392.
17. *Ji L., Sun G., Li J., Wang Y., Du Y., Li X., Liu Y.* // *Fish Shellfish Immunol.* 2017. V. 64. P. 56–67.
18. *Kiron V., Puangkaew J., Ishizaka K., Satoh S., Watanabe T.* // *Aquac.* 2004. V. 234. № 1–4. P. 361–379.
19. *Kumar N., Jadhao S.B., Chandan N.K., Kumar K., Jha A.K., Bhushan S., Rana R.S.* // *Fish Physiol. Biochem.* 2012. V. 38. № 4. P. 989–1000.
20. *Pinedo-Gil J., Martín-Diana A.B., Bertotto D., Sanz-Calvo M.A., Jover-Cerdá M., Tomás-Vidal A.* // *Fish Physiol. Biochem.* 2018. V. 44. № 3. P. 939–948.
21. *Awad E., Austin D., Lyndon A.R.* // *Aquac.* 2013. V. 388. № 15. P. 193–197.

22. *Awad E., Awaad A.S., Esteban M.A.* // Fish Shellfish Immunol. 2015. V. 43. № 1. P. 43–50.
23. *Folch J., Lees M., Stanley G.H.S.* // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
24. *Engelbrecht F.M., Mari F., Anderson J.T.* // S. A. Med. J. 1974. V. 48. № 7. P. 250–256.
25. *Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова З.А.* // Лососевые (Salmonidae) Карелии. Вып. 1. Петрозаводск: КФАН СССР, 1972. С. 150–163.
26. *Arduini A., Peschechera A., Dottori S., Sciarroni A.F., Serafini F., Calvani M.* // J. Lipid Res. 1996. V. 37. № 3. P. 684–689.
27. *Bilinski E.* // Can. J. Biochem. Physiol. 1963. V. 41. № 1. P. 107–112.
28. *Castell J.D., Lee D.J., Sinnhuber R.O.* // J. Nutr. 1972. V. 102. № 1. P. 93–99.
29. *Das U.N.* // J. Adv. Res. 2018. V. 11. № 1. P. 57–66.
30. *Martinez-Rubio L., Morais S., Evensen Ø., Wadsworth S., Vecino J.G., Ruohonen K., Tocher D.R.* // Fish Shellfish Immunol. 2013. V. 34. № 6. P. 1533–1545.

Dependence of Lipid and Unsaturated Fatty Acid Composition in the Rainbow Trout Skeletal Muscle on the Rearing Conditions and Physiological State of Fish

N. N. Fokina^{a,*}, L. A. Lysenko^a, T. R. Ruokolainen^a, I. V. Sukhovskaya^a,
N. P. Kantserova^a, and N. N. Nemova^a

^a*Institute of Biology, Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia*

^{*}*e-mail: fokinann@gmail.com*

A final product of fish production, skeletal muscle of fish, is a source of animal protein, phospholipids, and polyunsaturated fatty acids, essential for human consumption. The effects of rearing conditions (seasonal temperature and oxygen regimens) and physiological state (infectious status) on lipid composition of the skeletal muscle of two-years-old rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, grown in cages on a natural lake were studied. There were detected that body growth rate in trout juveniles decreased with water temperature increase, sporadic bacterial infection and subsequent antimicrobial therapy. Besides, excessive accumulation of reserve lipids (triacylglycerols), and increased saturation of the membrane lipids in fish muscle were shown. In order to mitigate the impacts of exogenous factors and bacterial infection, the dietary supplementation with antioxidant additive, including dihydroquercetin and arabinogalactan, were applied. It was shown that in supplement-feeding fish tissue lipid composition and unsaturated fatty acid content were more stable indicating better consumption characteristics and balanced nutrient composition of resulting fish product.

Keywords: dihydroquercetin, rainbow trout, phospholipids, triacylglycerols, polyunsaturated fatty acids