

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 1, 2022

Деструкция и трансформация фитогормонов микроорганизмами <i>Д. С. Сырова, А. И. Шапошников, О. С. Юзихин, А. А. Белимов</i>	3
Электрометаногенез – перспективная биотехнология анаэробной переработки органических отходов (обзор) <i>Ю. В. Литти, Ю. И. Русскова, Е. А. Журавлёва, С. Н. Паршина, А. А. Ковалёв, Д. А. Ковалёв, А. Н. Ножевникова</i>	23
Пероксидазная активность леглобина клубеньков бобов (<i>Vicia faba</i> L.) по отношению к гидропероксиду трет-бутила <i>О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, А. Ф. Топунов</i>	44
Активация биосинтеза стилибенов в культуре клеток винограда при помощи биопрепаратов на основе эндофитов дикорастущего винограда <i>Vitis amurensis</i> Rupr. <i>О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Супрун, К. В. Киселёв</i>	53
Иммобилизация смешанной культуры оксигенных фототрофных микроорганизмов на хитозановом сорбенте для биоизъятия биогенных элементов из сточных вод <i>С. Г. Васильева, Л. Р. Семёнова, И. О. Селях, О. Б. Чивкунова, П. Н. Щербаков, О. И. Баулина, О. А. Горелова, Е. С. Лобакова</i>	66
Параметры роста и антиоксидантная активность в проростках огурца при применении конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами в условиях солевого стресса <i>Е. Л. Недведь, Ж. Н. Калацкая, И. А. Овчинников, Е. И. Рыбинская, А. Н. Красковский, В. В. Николайчук, К. С. Гилевская, В. И. Куликовская, В. Е. Агабеков, Н. А. Ламан</i>	74
Конъюгаты иммуноглобулин-связывающий белок – наночастица золота: определение состава и применение в иммунохроматографическом анализе сульфониламида <i>Д. В. Сотников, Л. В. Баршевская, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев</i>	83
Методические аспекты исследования жирных кислот в биологических образцах <i>В. А. Зотов, В. В. Бессонов, Д. В. Рисник</i>	90

CONTENTS

Vol. 58, No. 1, 2022

Destruction and Transformation of Phytohormones by Microorganisms <i>D. S. Syrova, A. I. Shaposhnikov, O. S. Yuzikhin, and A.A. Belimov</i>	3
Electromethanogenesis is a Perspective Biotechnology of Anaerobic Treatment of Organic Waste <i>Yu. V. Litti, Yu. I. Russkova, E. A. Zhuravleva, S. N. Parshina, A. A. Kovalev, D. A. Kovalev, and A. N. Nozhevnikova</i>	23
Peroxidase Activity of Leghemoglobin of the Bean (<i>Vicia faba</i> L.) Nodules in Relation to <i>tret</i> -Butyl Hydroperoxide <i>O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina, and A. F. Topunov</i>	44
Activation of Stilbene Biosynthesis in Grape Cell Culture Using Supplements Based of Wild Grapes <i>Vitis amurensis</i> Rupr. Endophytes <i>O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, A. R. Suprun, and K. V. Kiselev</i>	53
Immobilization of a Mixed Culture of Oxygenic Phototrophic Microorganisms on a Chitosan-Based Sorbent for Nutrient Bioremoval <i>S. G. Vasilieva, L. R. Semenova, I. O. Selyakh, O. B. Chivkunova, P. N. Shcherbakov, O. I. Baulina, O. A. Gorelova, and E. S. Lobakova</i>	66
Growth Parameters and Antioxidant Activity in Cucumber Seedlings with Application of Chitosan and Hydroxycinnamic Acids Conjugates under Salt Stress <i>E. L. Nedved, J. N. Kalatskaja, I. A. Ovchinnikov, E. I. Rybinskaya, A. N. Kraskouski, V. V. Nikalaichuk, K. S. Hileuskaya, V. I. Kulikouskaya, V. E. Agabekov, and N. A. Laman</i>	74
Conjugates of Immunoglobulin-Binding Protein and Gold Nanoparticle: Determination of Composition and Application in Immunochromatographic Analysis of Sulfonylamide <i>D. V. Sotnikov, L. V. Barshevskaya, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev</i>	83
Methodological Aspects of Analysis of Fatty Acids in Biological Samples <i>V. A. Zotov, V. V. Bessonov, and D. V. Risnik</i>	90

УДК 579.222:579.64:579.262:577.171.4:58.071

ДЕСТРУКЦИЯ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ФИТОГОРМОНОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2022 г. Д. С. Сырова¹, А. И. Шапошников¹, О. С. Юзихин^{1, 2}, А. А. Белимов^{1, *}

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

²Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608 Россия

*e-mail: belimov@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.06.2021 г.

После доработки 30.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Фитогормоны – это группа разнообразных по строению низкомолекулярных органических веществ, которые выполняют функции регуляции всех процессов жизнедеятельности растений. Хорошо известно, что способностью синтезировать фитогормоны обладают многие микроорганизмы, вступающие во взаимодействия с растениями. Однако полезные и патогенные микроорганизмы могут деструктировать, трансформировать, утилизировать в качестве источника питания и влиять на концентрацию фитогормонов в растениях. В данном обзоре обсуждаются вопросы распространения этих свойств у почвенных и ассоциированных с растениями бактерий и грибов, а также биохимические пути микробной деструкции и трансформации основных классов фитогормонов. Представлен анализ информации о взаимодействии микроорганизмов с растениями, обусловленных модуляцией содержания фитогормонов, и роли данных явлений в образовании симбиотических растительно-микробных систем.

Ключевые слова: ауксины, биоконтроль, гиббереллины, жасмонаты, микробно-растительные взаимодействия, салициловая кислота, симбиоз, фитогормоны, фитопатогены, цитокинины, этилен

DOI: 10.31857/S0555109922010093

Фитогормонами называют вырабатываемые растениями низкомолекулярные органические вещества, которые выполняют регуляторные функции всех процессов их жизнедеятельности [1–3]. К основным группам фитогормонов относят ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовую кислоту, этилен, салициловую кислоту и жасмонаты. Способностью синтезировать фитогормоны обладают также многие микроорганизмы, вступающие во взаимодействия с растениями. С одной стороны, накоплен большой экспериментальный материал о важной роли фитогормонов симбиотических бактерий и грибов в стимуляции роста [4–6] и устойчивости растений к стрессам [7, 8]. С другой стороны, в литературе обсуждаются способность фитопатогенов продуцировать фитогормоны и механизмы участия этого свойства в патогенезе [9, 10]. Однако полезные и патогенные микроорганизмы способны не только синтезировать фитогормоны, но и влиять на их содержание в среде и растениях за счет деструкции, трансформации и использования этих веществ в качестве источника питания. Фитопатогены ингибируют биосинтез фитогормонов в растениях и нарушают их взаимодействие и сигнальные пути с помощью раз-

нообразных токсинов и эффекторов [11, 12]. Информация об этих процессах в литературе представлена недостаточно и их значение в растительно-микробных взаимодействиях в основном остается на уровне теоретических предположений и гипотез. Интригующими остаются вопросы о том, почему способностью утилизировать фитогормоны обладают как полезные, так и фитопатогенные микроорганизмы и каким образом эти микроорганизмы используют данное свойство в образовании мутуалистических симбиосистем и патосистем. В данном обзоре представлен анализ литературы о способности полезных и фитопатогенных микроорганизмов утилизировать и трансформировать основные классы фитогормонов и таким образом влиять на концентрацию фитогормонов и рост растений.

Ауксины. Ауксинами является группа биологически активных производных индола, а именно индолил-3-уксусная (ИУК), 3-(3-индолил)-пропионовая, индолил-3-масляная и 4-хлориндолил-3-уксусная кислоты, при этом наиболее активным и важным является ИУК [2]. Ауксины играют ключевую роль в онтогенезе и физиологии растений: стимулируют работу ионных каналов,

растяжение клеток и закладку боковых корней, контролируют фото- и гравитропические реакции, а также обеспечивают взаимодействие отдельных органов растений [1, 3, 13]. Способность к биосинтезу ауксинов широко распространена среди присутствующих в почве и ассоциированных с растениями микроорганизмов, в том числе ассоциативных, клубеньковых и эндофитных бактерий, микоризных и эндофитных грибов, а также разнообразных фитопатогенов [4, 14–16]. Функциональное значение микробного синтеза ауксинов в первую очередь рассматривается в рамках растительно-микробных взаимодействий, хотя обсуждается также роль ИУК во взаимодействии микроорганизмов с животными и ее роль как коммуникативного сигнала в бактериальных популяциях [16, 17].

Микроорганизмы, способные утилизировать или трансформировать ИУК, относятся к разнообразной группе аэробных и анаэробных биодеструкторов индола и других гетероциклических ароматических соединений. Краткая информация об этих микроорганизмах суммирована в недавнем обстоятельном обзоре на эту тему [17]. Впервые предположение об участии почвенных микроорганизмов в деградации ИУК было высказано в 1940 г. [18]. В дальнейшем в ряде работ была показана интенсивная деградация вносимой в почву ИУК [19, 20]. Внесение различных видов рода *Arthrobacter* в стерилизованную почву приводило к полной деградации ИУК после 7 сут инкубации, а в контрольном варианте содержание ИУК снижалось за это время только на 60% [19]. В нестерильной почве 90% экзогенной ИУК разлагалось уже в течение первых 24 ч. Добавление различных органических веществ (пептон, рибоза, ксилоза и крахмал) снижало разложение ИУК в почве [19, 20]. Это могло быть связано с преимущественным использованием микробами более доступных источников углерода и азота, или со стимулирующим действием органических веществ на биосинтез ауксина микроорганизмами.

Основными объектами выделения бактерий, способных катаболизировать ИУК, являются почва и ризосфера растений [17]. В рубец жвачных животных они вероятно также попадают вместе с растениями и частицами почвы. Сообщалось о полной деградации (минерализации) ИУК типичными представителями ризосферных бактерий родов *Alcaligenes* [21], *Achromobacter* [22], *Arthrobacter* [22], *Azospirillum* [23], *Burkholderia* [24], *Lelliottia* [22], *Pseudomonas* [22, 25], *Rhodococcus* и *Sphingomonas* [22, 24]. Катаболизм ауксинов был выявлен также у клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* [26], *Sinorhizobium meliloti* [27], *Rhizobium lupini* [28] и *Rhizobium phaseoli* [29]. Развитие методов секвенирования и биоинформационного анализа геномов постоянно пополняют список микроорганизмов, потенциально способ-

ных к деструкции ИУК [17]. Накопленные результаты свидетельствуют о распространенности деструкторов ауксинов в обогащенных этими веществами экологических нишах, которые представляют ризосферная почва и сами растения [17]. Интересной представляется гипотеза о том, что способность симбиотических бактерий одновременно синтезировать и разлагать ИУК [25, 30, 31] связана с эволюционным развитием у них механизмов контроля метаболизма собственной ИУК для повышения эффективности их взаимодействия с растениями.

В настоящее время известно несколько биохимических путей бактериальной деградации ИУК, и их подробная характеристика представлена в нескольких обзорах [22, 24]. В аэробных условиях деградация молекул ИУК проходит с образованием катехола, который служит центральным метаболитом аэробной деградации широкого спектра ароматических соединений [32]. Выявлено два пути образования катехола из ИУК. В первом случае происходит последовательное превращение молекулы ИУК в скатол (3-метилиндол) и салициловую кислоту, например у *Lactobacillus* sp. [33]. Недавно были выделены штаммы *Achromobacter* sp. AB2, *Achromobacter xylosoxidans* SOLR10, *Burkholderia* sp. TRE3 и *Pseudomonas* sp. PLMAX, способные расти как на ИУК, так и на салициловой кислоте [22], но механизм деструкции фитогормонов этими штаммами пока не изучен. Второй путь связан с образованием катехола и промежуточных продуктов 3-гидрокси-2-оксиндол-3-уксусной кислоты (диокс-ИУК) и 2-гидрокси-ИУК [24]. Катехол является первым продуктом катаболизма ИУК, для которого были структурно и функционально охарактеризованы гены (кластер *iacABCDEFGRHI*) и механизмы регуляции их экспрессии [24, 30, 34, 35]. В дальнейшем катехол метаболизируется по β -кетoadипатному пути, конечными продуктами которого являются ацетил-КоА и сукцинил-КоА [36]. Участие β -кетoadипатного пути в катаболизме ИУК экспериментально подтверждено у *Pseudomonas putida* 1290, *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 и *Enterobacter soli* LF7 [25, 34, 37]. Антранилатный путь катаболизма ИУК с образованием в качестве промежуточных продуктов диоксиндола и изатина выявлен у штамма клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* 110 [38]. Выделенный из активного ила очистных сооружений штамм *Alcaligenes* sp. In3 метаболизировал ИУК по гентизатному пути с образованием в качестве интермедиатов изатина и антраниловой кислоты [21]. Показано существование и других механизмов аэробного катаболизма ИУК. Так, неидентифицированная бактерия расщепляла индольное кольцо ИУК с образованием 2-формаминобензоилуксусной кислоты [39], а в экспериментах с культивированием штамма *Rhizobium*

phaseoli 8002 на среде с $[^2\text{H}_5]$ ИУК происходила ее трансформация в индол-3-метанол [29].

В анаэробных условиях бактерии утилизируют ИУК с образованием 2-аминобензоил-КоА — промежуточного продукта анаэробного катаболизма широкого спектра ароматических соединений, включающегося затем в реакции центрального метаболизма клетки [40]. Данный путь кодируется генным кластером *iaaABCDEFGHIJKLM*, который впервые был охарактеризован у *Aromatoleum aromaticum* EbN1 и *Azoarcus evansii* KB 740 [41]. Интересно, что у гипертермофильной археи *Ferroglobus placidus* AEDП12DO триптофан метаболизируется до ИУК, которая затем катаболизируется через 2-аминобензоил-КоА [42].

Только некоторые бактерии, катаболизирующие ИУК, могут использовать ее в качестве источника азота [25]. Предполагается, что это связано с более энергозатратным усвоением органического азота из продуктов метаболизма ИУК в виде амина или амида, требующим дополнительных генов и ферментов [17]. Однако, эти гены и возможные пути усвоения микроорганизмами азота из ИУК остаются неизученными.

В растениях значительная часть ИУК содержится в конъюгированной форме, в основном в виде ИУК-глюкозы и конъюгатов с различными аминокислотами [43]. Их роль разнообразна: они участвуют в транспорте, хранении и защите ИУК от ферментативной деградации и контролируют клеточный гомеостаз ИУК [13, 44]. Образование конъюгатов ИУК в виде сложных эфиров и амида распространено также у микроорганизмов. Например, *Bacillus megatherium* гликозилировал индол-3-пировиноградную кислоту [45] и ИУК [46]. При росте на среде с ИУК и лизинем *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* синтезировал 3-индолацетил- β -L-лизин [47], а галлообразующий фитопатоген *Pseudomonas savastanoi* образовывал ИУК-лизин [48]. Фитопатогенный гриб *Acremonium roseum* синтезирует ингибитор роста растений акремоауксин А, представляющий собой конъюгат 2-(3-индол)пропионовой кислоты и арабитола [49]. В бактериях некоторые промежуточные продукты биосинтеза ИУК могут использоваться в качестве запасных соединений, таких как индол-3-молочная кислота (ИМК), индол-3-этанол или триптофол [15].

Грибы также способны трансформировать и утилизировать ИУК. Эксперименты с ^{14}C -ИУК выявили превращение ИУК в 5-гидрокси-ИУК у гриба *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne SD58 [50]. Известно, что гидроксилирование ИУК приводит к потере его активности [4]. Грибы *Aspergillus niger* и *A. sydowii* продуцировали ИУК с последующим образованием 5-гидрокси-ИУК из триптамина [51]. Из гриба *Omphalia flavida* был выделен фермент, который за счет потребления кислорода

окислял ИУК с образованием нестабильного промежуточного продукта, разлагавшегося на другие не идентифицированные продукты [52]. Окисляющие ИУК ферменты (Mn-зависимая ИУК-оксидаза и лакказа) были обнаружены у фитопатогенного гриба *Marasmius perniciosus* [53]. Описано также существование у грибов ферментных систем расщепления катехола через *цис,цис*-муконовую кислоту, что свидетельствует о деградации ИУК по механизму, сходному с катехолатным путем, распространенным у бактерий [32].

В настоящее время накоплен обширный материал о положительном влиянии продуцирующих ауксины симбиотических микроорганизмов, в основном бактерий, на рост, минеральное питание и устойчивость к абиотическим стрессам различных растений [4, 8, 54]. В то же время отмечается, что прямых доказательств участия именно микробных ауксинов в метаболизме растений не много [5, 54].

Ряд исследований указывают на важную роль катаболизма и регуляции сигналинга ИУК в симбиотических процессах и стимуляции роста растений. Для формирования клубеньков в бобово-ризобиальном симбиозе необходимо локальное повышение соотношения цитокининов к ауксинам. Показано, что обработка корней Nod-факторами клубеньковых бактерий ингибирует транспорт ауксинов [55, 56]. Бактероиды, выделенные из клубеньков сои (*Glycine max* L.), разрушали ИУК при инкубации в аэробных условиях [27] предположительно посредством действия трехвалентной формы соевого леггемоглобина [27]. Продукт ИУК *Bradyrhizobium japonicum* E109 способен также ее разрушать, не используя в качестве питательного субстрата, что может быть механизмом тонкой настройки микросимбиотом баланса ИУК в образующемся клубеньке [31]. Положительный эффект продуцента ИУК *Klebsiella* sp. Sal 1 на рост корней томата и редиса ослаблялся при совместной инокуляции с ИУК-деградирующим штаммом *Herbaspirillum* sp. Sal 6 [57]. С другой стороны, совместная инокуляция редиса ИУК-деградирующим штаммом *P. putida* 1290 и суперпродуцентами ИУК фитопатогенами *Rahnelia aquaticus* и *Pseudomonas syringae* уменьшала ингибирование роста корней, вызванное избытком ауксина [25]. Способность к деградации ИУК оказалась необходимой для стимуляции роста растений арабидопсиса штаммом *B. phytofirmans* PsJN, поскольку мутант с дефектным геном *iacC*, контролирующим деструкцию ауксинов, хуже колонизировал и не стимулировал рост корней [30].

Сообщалось, что диокс-ИУК, промежуточный продукт бактериальной деградации ИУК, является основным первичным метаболитом деградации ИУК растениями арабидопсиса [58]. Высказано предположение, что диокс-ИУК входит в состав

корневых экссудатов и является субстратом для ризосферных микроорганизмов [34]. В этом случае экссудация диокс-ИУК, возможно, служит одним из факторов регуляции части микробиома растений, участвующего в метаболизме фитогормонов.

Гиббереллины. Гиббереллины (Gibberellic acid, GA) – это фитогормоны дитерпеновой природы, синтезируемые из *энт*-каурена и имеющие тетраинти пентациклическую (с дополнительным пятичленным лактонным кольцом) структуру [59]. Растения содержат смесь нескольких GA с высокой физиологической активностью (например, GA₁, GA₃, GA₄, GA₇) и промежуточных продуктов биосинтеза или катаболитов активных GA [60]. GA участвуют в удлинении стебля, цветении, развитии плодов, нарушении покоя семян и других процессах развития растений [59, 60].

Наряду с растениями GA синтезируют также некоторые ассоциированные с растениями бактерии и грибы [4, 61, 62]. Следует отметить, что впервые GA были обнаружены у фитопатогенного гриба *Gibberella fujikuroi* (по новой классификации *Fusarium fujikuroi*), который вызывал аномальное удлинение междоузлий и стерильность колосьев риса [63]. В настоящее время нет доказательств того, что микроорганизмы способны полностью катаболизировать GA, используя их в качестве источника питательных веществ. Известные процессы микробного метаболизма GA являются структурной трансформацией молекул и составной частью способности к их биосинтезу [61, 62]. В частности, ассоциативные азотфиксаторы *Azospirillum lipoferum* могут метаболизировать GA как *in vitro* в питательной среде [64–66], так и *in vivo* при инокуляции прорастающих семян [67]. При культивировании на синтетических средах *A. lipoferum* продуцировали GA₁₉, являющийся прекурсором для дальнейшего биосинтеза GA₁ через промежуточную стадию трансформации GA₁₉ в GA₂₀ [64]. В аналогичных экспериментах с *A. lipoferum* меченый GA₉ трансформировался бактериями до GA₃, а GA₂₀ являлся субстратом для синтеза GA₁ [65]. Кроме того, была выявлена способность *A. lipoferum* гидролизовать как простые, так и сложноэфирные гликозиды GA₂₀ [66].

Роль GA в растительно-микробных взаимодействиях может быть связана с синтезом или трансформацией этих фитогормонов микроорганизмами и с вмешательством микроорганизмов в регуляторные процессы гиббереллинового сигналинга у растений. Для штаммов ассоциативных азотфиксаторов *A. lipoferum* USA5b и *A. brasilense* Cd была показана непосредственная роль синтезируемых ими GA в стимуляции роста карликового риса, дефицитного по синтезу GA [67]. Комбинированная роль GA в качестве промотора и ингибитора образования симбиотических клу-

беньков обусловлена локальной модуляцией ризобиями биосинтеза и действия этих фитогормонов в инфекционных нитях [68]. Микоризный гриб *Rhizophagus irregularis* вызывал радиальное утолщение коры корня у *Medicago truncatula*, необходимое для развития грибных арбускул, путем блокирования GA сигналов [69].

Проведенные исследования показывают роль растения во взаимодействии с ассоциированными микроорганизмами за счёт образуемых GA. В то же время, роль микроорганизмов как продуцентов и трансформаторов или деструкторов GA в этих процессах остается неизученной. Однако, имеются наблюдения, свидетельствующие об участии микроорганизмов в биосинтезе и трансформации этих фитогормонов, и это может влиять на рост, формирование симбиоза и устойчивость растений к стрессам. Раскрытие механизмов модуляции концентраций GA в растениях симбиотическими и патогенными микроорганизмами поможет дать ответы на многие противоречивые наблюдения о функционировании растительно-микробных систем.

Цитокинины. Цитокинины (ЦК) представляют собой N⁶-замещенные производные аденина, которые влияют на деление клеток, инициацию роста побегов, апикальное доминирование, минеральное питание, филлотаксис, развитие сосудов, формирование гаметофитов и эмбрионов, старение листьев, адаптацию к абиотическим стрессам и другие физиологические и биохимические процессы [70]. Пул активных ЦК поддерживается в растении за счет метаболических взаимопревращений цитокининовых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и N- и O-гликозидов [70]. Необратимая дезактивация достигается действием флавопротеина цитокинин оксидазы/дегидрогеназы (СКХ), кодируемого небольшим семейством генов СКХ. Этот фермент отщепляет боковую цепь ЦК с образованием аденина или аденозина и альдегида [71].

К настоящему времени синтез ЦК, в основном N⁶-(2-изопентенил)аденина (iPA), зеатина и их производных, микроорганизмами изучен достаточно хорошо [5, 12, 14, 72]. Недавно описан также механизм биоконтроля фитопатогенов арабидопсиса, непосредственно связанный со способностью рост-стимулирующих бактерий продуцировать ЦК [73]. В этом исследовании мутанты бактерий *P. fluorescens*, не способные продуцировать ЦК, теряли биоконтрольную активность против *P. syringae*, а мутанты арабидопсиса по генам биосинтеза ЦК были более чувствительны к фитопатогену. Значительно меньше известно о микробной деградации ЦК. С помощью иммуноаффинной хроматографии было показано, что почвенная бактерия *Paenabacillus polymyxa* В2 не только продуцировала iPA, но и снижала концентрацию N⁶-

изопентениладенозин рибозида (iPR) в питательной среде [74]. Однако, деградация iPR с активностью штамма В2 в этих экспериментах могла быть связана с химическими процессами. Скрининг 60000 изолятов бактерий из почв Канады по способности использовать синтетический цитокинин N⁶-бензиладенин в качестве источника углерода выявил только один штамм *Serratia proteamaculans* В1, при этом основным продуктом деградации был 8-гидрокси-N⁶-бензиладенин [68]. Штамм *S. proteamaculans* В1 также метаболизировал iPA окислением пуринового кольца с образованием 8-гидроксиаденина и 8-гидроксиизопентениладенина [75]. Участие фермента ксантиндегидрогеназы (Xdh, КФ 1.1.1.204) в деградации ЦК было подтверждено клонированием генов *XdhAB* в *E. coli*, трансформанты которой метаболизировали N⁶-бензиладенин до 8-гидрокси-N⁶-бензиладенина [75]. Подобно другим бактериальным ксантиндегидрогеназам, фермент этого штамма состоит из двух субъединиц, аминокислотные последовательности которых наиболее сходны с последовательностями у *Pseudomonas aeruginosa* [75]. Низкая частота встречаемости ЦК-утилизирующих изолятов была вероятно связана с тем, что перед выделением бактерий в почву вносили измельченный растительный материал, а не чистые цитокинины [75]. Обогащение среды дополнительными источниками питания могло привести к активному развитию нецелевых микроорганизмов и конкурентному вытеснению бактерий, утилизирующих ЦК.

Метаболизм ЦК был изучен у грибного гембиотрофного патогена масличного рапса *Leptospheria maculans* [72]. Наряду с продукцией различных производных *цис*-зеатина, iPA и дигидрозеатина *in vitro*, этот гриб снижал концентрацию iPA в среде при добавлении N⁶-бензиладенина и кинетина. При этом ни в составе эндометаболитов мицелия, ни в культуральной жидкости не было обнаружено известных продуктов метаболической трансформации iPA (рибозидов, нуклеотидов, гликозидов), которые могли бы объяснить наблюдаемый эффект. Исследование ферментативной активности у *L. maculans* впервые показало наличие СКХ, вызывающей необратимую деградацию iPA [72]. Фермент FasE, гомологичный СКХ растений, был обнаружен у бактериального фитопатогена *Rhodococcus fascians* D188 [76]. Похожие белки были идентифицированы и у других видов бактерий, таких как *Streptoalloteichus hindustanus*, *Streptomyces turgidiscabies* [77], *Herpetosiphon aurantiacus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Mycococcus xanthus* и *Saccharopolyspora erythraea* [71], но их функциональные свойства и роль в модуляции растительных цитокининов не ясна.

ЦК участвуют в контроле начальных стадий бобово-ризобиального [78] и микоризного [79]

симбиозов, а также являются регуляторными сигналами в процессах патогенеза [12, 80, 81]. Известные растительно-микробные взаимодействия обычно сопровождаются повышением концентрации ЦК в растительных тканях за счет активации *IPT*-генов, определяющих синтез ЦК *de novo* в растениях, а также в результате микробного биосинтеза этих фитогормонов [54, 82, 83]. Была высказана гипотеза о ключевой роли в поддержании баланса ЦК в растениях эндофитными бактериями *Methylobacterium extorquens* и *M. fujisawaense*, которые активно продуцировали предшественники ЦК [84], *транс*-зеатин [85] и iPA [85].

Влияние микроорганизмов, способных утилизировать или трансформировать ЦК, на процессы роста и гормональный баланс растений остаются неизученными вопросами. Было только показано, что *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026 в 3 раза снижал количество iPA в корнях проростков гороха в первую неделю после инокуляции [83]. Однако способность деградировать ЦК этим штаммом не изучалась. Известно, что симбиотические клубеньки бобовых растений содержат повышенные концентрации ЦК, которые необходимы для их морфогенеза [78]. Обработка растений ЦК вызывает развитие на корнях клубенькоподобных структур [86, 87]. Повышенная аккумуляция ЦК в корнях характерна для растений, находящихся в симбиозе с арбускулярной микоризой [79]. С другой стороны, обсуждается негативная роль ЦК в начальных фазах инфицирования клеток эпидермиса корней клубеньковыми бактериями [88]. Показано также, что снижение уровня ЦК в растениях табака за счет конститутивной экспрессии гена *СКХ2* (35S:СКХ2) стимулировало развитие гиф микоризного гриба *Rhizophagus intraradices* в корнях [89]. Инокуляция ЦК-продуцирующими ризобактериями *Bacillus subtilis* повышала биомассу растений пшеницы [90] и салата [82], но уменьшала длину корней салата [82]. Негативный эффект таких ризобактерий на удлинение корней проявлялся в условиях засухи [82], что в определенных условиях дефицита или минерального питания может оказать отрицательный эффект на рост растений. Изменение баланса ЦК в растениях происходит при внедрении патогенов, которые влияют на биосинтез и метаболизм ЦК, а также на передачу сигналов, модулируемых ЦК хозяина [12, 80]. Некоторые формы ЦК, синтезируемые *Rhodococcus fascians*, устойчивы к деградации растительными ферментами, что позволяет им накапливаться в растении и перепрограммировать развитие клеток в сторону усиления восприимчивости инфекции [76].

Приведенные выше примеры свидетельствуют о том, что растениям необходимо поддерживать оптимальный для роста и защиты от патогенов

уровень ЦК. Накопление ЦК в тканях может оказывать как положительный, так и негативный эффект на рост и устойчивость растений к стрессам, и это зависит от штамма микроорганизма, генотипа растения и условий эксперимента [1].

Этилен. Этилен – газообразный фитогормон, который синтезируется во всех органах высших растений и принимает участие во многих аспектах их роста и развития на протяжении всего жизненного цикла, включая прорастание семян, развитие проростков, регуляцию роста корней, цветение, созревание плодов, старение и опадание листьев [91, 92]. Важная роль этилена заключается в модуляции сигнальных путей других фитогормонов [93]. Этилен называют также гормоном стресса, так как он участвует в неспецифических реакциях растений на биотические и абиотические стрессовые факторы [94]. Однако активный биосинтез этилена в стрессовых условиях активизирует его роль в качестве ингибитора роста растений, и это имеет для них негативные последствия, особенно при восстановлении нормального метаболизма после прекращения действия стрессового фактора [91, 92, 95].

Механизмы биосинтеза этилена растениями детально изучены и подробно освещены в обзорных статьях [96]. Из аминокислоты метионина с помощью S-аденозил-метионин-синтетазы образуется S-аденозил-метионин, который превращается ферментом АЦК-синтазой в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК). В дальнейшем АЦК окисляется АЦК-оксидазой с образованием этилена, CO₂ и цианида, который детоксифицируется до β-цианоаланина с помощью β-цианоаланин-синтазы. У микроорганизмов этилен образуется через 2-кето-4-метилтиомасляную кислоту (производное метионина) посредством НАДН:Fe(III) ЭДТА-оксидоредуктазы, или через 2-оксоглутарат этилен-образующим ферментом (EFE, ethylene forming enzyme). Первый метаболический путь характерен для таких микроорганизмов как *Escherichia coli* и *Cryptococcus albidus*, а второй для *P. syringae* и *Penicillium digitatum* [4, 97].

В середине прошлого века исследователей заинтересовало явление поглощения почвой этилена, которое происходило только в нестерильной почве и свидетельствовало об участии микроорганизмов в данном процессе [98]. Затем был идентифицирован штамм *Mycobacterium paraffinicum* E20, способный в аэробных условиях метаболизировать этилен с помощью специфичной монооксигеназы до этиленоксида с последующим вовлечением метаболитов этилена в гликоцилатный цикл [99, 100]. Позднее микробная деградация этилена в присутствии кислорода и углекислого газа была описана у *P. putida* AJ и *Ochrobactrum* sp. TD с образованием оксида [101]. Присутствие алкен-монооксигеназы позволило бактерии *Rhodo-*

coccus corallinus метаболизировать также трихлорэтилен [102]. В анаэробных условиях этилен восстанавливался до этана метаногенными бактериями из родов *Methanospirillum* и *Methanosarcina* [103]. Детальная информация о микробной деградации этилена и путях метаболизма короткоцепочечных алкенов бактериями из родов *Nocardia*, *Nocardiodes*, *Xanthomonas*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas* представлена в обзоре Шеннана [104].

Бактериальные деструкторы этилена в основном были объектами изучения биотрансформации различных углеводов, и их краткая характеристика представлена в табл. 1. Но способность микроорганизмов влиять на растения посредством деструкции этилена мало изучена. Обнаружение хемотаксиса некоторых ризосферных этилен-утилизирующих бактерий рода *Pseudomonas* к этилену позволило предположить участие бактериальной деструкции этилена в становлении растительно-микробных взаимодействий [105]. Высказана гипотеза о том, что присутствие деструкторов этилена в компостах влияет на рост сельскохозяйственных растений [106]. Было также показано, что биогумус способен поглощать этилен благодаря активности представителей родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Mycobacterium* [107]. Интересной представляется гипотеза о совместной регуляции концентрации этилена в корневой зоне растениями и микроорганизмами, которая модулирует адаптивный потенциал растений за счет балансирования процессами биосинтеза, деструкции и восприятия этилена растениями [108]. Однако, прямых доказательств участия микробного метаболизма этилена в этих процессах не представлено.

Этилен играет важную роль в образовании мутуалистических симбиозов, которая может быть как положительной, так и отрицательной в зависимости от концентрации этилена, конкретного процесса интеграции и вида симбионтов, а также от условий внешней среды [95]. Эти симбиотические взаимодействия во многом обусловлены микробным ферментом АЦК-деаминазой, которая гидролизует предшественник этилена АЦК с образованием аммония и α-кетобутирата [109]. Микроорганизмы используют аммоний в качестве источника азота [110], а α-кетобутират – в качестве источника углерода [111]. Благодаря этому происходит снижение интенсивности биосинтеза этилена и его ингибирующего действия на рост растения, особенно в стрессовых условиях.

Изучению фермента АЦК-деаминазы у бактерий и его положительной роли во взаимодействии с растениями в стрессовых условиях посвящено большое количество публикаций, в том числе обзорных статей [95, 110, 112–114], поэтому в данном обзоре этот вопрос не рассматривается подробно. Однако необходимо подчеркнуть зна-

Таблица 1. Микроорганизмы-деструкторы этилена

Название микроорганизма	Происхождение штамма	Дизайн и методы исследований	Основная функция микроорганизма	Источник
<i>Mycobacterium</i> sp. 2W и E3	Почва	Периодическая культура на селективной среде с этиленом, газовая хроматография	Алкен-утилизирующие бактерии	[106]
<i>Mycobacterium</i> sp. E3	Почва	Периодическая культура на селективной среде с этиленом, газовая хроматография	Деструктор этилена в компостах	[106]
<i>Mycobacterium</i> sp. E20	Почва	Радиоактивное мечение кислорода в молекуле воды (¹⁸ O), газовая хроматография, масс-спектрометрия	Утилизатор короткоцепочечных углеводов	[99]
<i>Mycobacterium rhodesiae</i> JS60	Загрязненные этенами подземные воды	Периодическая культура на селективной среде с этиленом, газовая хроматография	Деструктор хлорированных алкенов	[195]
<i>Orchrobactrum</i> sp. TD	Полигон опасных отходов, Калифорния, США	Периодическое культивирование с добавлением оксида этилена	Деструкторы винилхлорида	[196]
<i>Pseudomonas putida</i> AJ	Полигон опасных отходов, Калифорния, США	Периодическое культивирование с добавлением оксида этилена	Деструкторы винилхлорида	[196]
<i>Rhodococcus corallinus</i> B-276	Почва	Обнаружение плазмиды с генами деградации алкенов и монооксигеназы	Биоокислитель пропена и трихлорэтена	[102]
Неидентифицированный штамм RD-4	Донные отложения на берегу озера	Периодическая культура на селективной среде с этиленом, газовая хроматография	Оптимизация хранения и транспортировки овощей	[197]
<i>Xanthobacter</i> sp. Py 2, Py3, Py7, Py10, Py11, Py17 и By2	Почва, Англия	Периодическая культура на селективной среде с этиленом, газовая хроматография	Алкен-утилизирующие бактерии	[114]

чимую роль этого фермента в защите растений от абиотических стрессов. Следует также отметить широкое распространение АЦК-дезаминазы у различных ассоциативных рост-стимулирующих [111, 113, 115, 116] и клубеньковых бактерий [117–119], что связано с горизонтальным переносом этих генов [120]. Благодаря интенсивному развитию секвенирования геномов бактерий показано, что АЦК-дезаминаза присутствует и у фитопатогенных видов [113]. Роль этого фермента в фитопатогенезе не изучена, но показано, что АЦК-утилизирующий фитопатоген *P. brassicacearum* Am3 маскировал себя посредством снижения индуцируемых этиленом защитных реакций томата [121].

Гораздо меньше известно о грибах, обладающих АЦК-дезаминазной активностью. Скрининг сапрофитных и фитопатогенных грибов родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Fusarium* выявил способность многих видов расти на

селективной среде с АЦК в качестве единственного источника азота [122]. АЦК-утилизирующие штаммы *Trichoderma* sp. TSK8 и SKS1 стимулировали рост мангровых побегов [123], а гриб *Trichoderma asperellum* MAP1 повышал активность фотосинтеза, снижал окислительный стресс и стимулировал рост пшеницы в условиях засухи [124]. Продукенты АЦК-дезаминазы *Aspergillus aculeatus*, изолированный из загрязненной Cd почвы, снижал токсичность этого металла для растений риса [125], а эндофит *A. niger* 9-р повышал продуктивность фасоли обыкновенной [126]. Эти результаты свидетельствуют о том, что грибная АЦК-дезаминаза тоже участвует во взаимодействии с растениями и их адаптации к стрессовым факторам.

Салициловая кислота. Фитогормон салициловая кислота (СК) – фенольное соединение, которое выполняет в растениях сигнальные функции, связанные с устойчивостью к различным стрессо-

вым факторам, особенно к повреждениям от биотрофных патогенов, индукцией сверхчувствительной реакции растительной ткани на атаку патогена и становлением локального и системного иммунитета [127, 128]. В растительно-микробных взаимодействиях СК участвует также в модуляции формирования ризосферных микробиомов [129].

В 1952 г. было показано, что почвенные бактерии *Pseudomonas fluorescens* росли на питательной среде, содержащей СК в качестве единственного источника углерода [130]. Позднее была описана способность почвенных псевдомонад деградировать СК с образованием катехола [131]. Бактериальная деградация СК до катехола достигалась гидроксилазным (мета-) и β -кетoadипатным (орто-) путями [132]. Все исследованные штаммы рода *Pseudomonas*, способные метаболизировать нафталин, также утилизировали СК посредством окисления до катехола [133]. В данном случае СК является промежуточным метаболитом в ходе микробной деградации нафталина с помощью катехол-2,3-диоксигеназы (мета-путь) или катехол-1,2-диоксигеназы (орто-путь). Утилизаторами СК были также бактерии родов *Bacillus*, *Arthrobacter* и *Rhodococcus*, способные деградировать ароматические соединения [134]. Недавние исследования метаболизма нафталина бактерией *P. putida* BS3701, деградирующей нафталин через салицилат, показали участие гена *nahU* (салицилат-гидроксилазы) в метаболизме СК до катехола [135]. Однако *P. butanovora* метаболизует СК в анаэробных условиях посредством нитрат-зависимой денитрификации [136]. Эта бактерия использует салицилат в качестве донора электронов для восстановления нитрата. Процесс осуществляется через катехол, который далее разлагается с помощью катехол-2,3-оксигеназы (мета-расщепление), образуя 2-гидроксимуконный полуальдегид [136]. Позднее было показано, что бактериальный штамм *Sphingomonas* sp. СНУ-1 способен разлагать СК посредством ферментов, отличных от ферментов деградации салицилата у псевдомонад [137]. В отличие от салицилат-1-гидроксилазы у *Pseudomonas*, которая представляет собой хорошо изученный флавопротеин, фермент у *Sphingomonas* sp. СНУ-1 представляет собой трехкомпонентный белковый комплекс Fe-S. Этот фермент катализирует гидроксилирование салицилата до катехола, а также способен метаболизировать метилсалицилат [137]. Разложение СК бактерией *Pseudaminobacter salicylatoxidans* осуществляется через прямое раскрытие кольца с помощью салицилат 1,2-диоксигеназы [138], а у бактерии *Streptomyces* WA46 салицилат разлагается посредством образования интермедиата КоА [139]. В составе конъюгативных плазмид SAL/CAP у бактерий рода *Pseudomonas* обнаружен ген *scpA*, кодирующий салицилат-1-гидроксилазу с низким (72–74%)

сходством нуклеотидной последовательности с известными гомологичными генами [140].

Микробная утилизация СК освещена в вышеприведенных исследованиях с точки зрения микробной деградации токсичных природных циклических соединений и ксенобиотиков, но не как фитогормона. Нами это проиллюстрировано в сводной табл. 2, в которой представлена краткая характеристика таких микроорганизмов. Тем не менее, растительная СК может накапливаться в растениях и почве и являться субстратом для микроорганизмов. Недавний скрининг почвенных и ассоциированных с растениями бактерий выявил несколько штаммов, а именно *Achromobacter* sp. AB2 и *A. xylooxidans* SOLR10, *Burkholderia* sp. TRE3, *Pseudomonas* sp. PLMAX и *Serratia marcescens* DAMR1, способных метаболизировать СК в качестве единственного источника углерода [22]. При выделении деструкторов фенантрена и нафталина с поверхности листьев городских древесных растений были селектированы бактерии родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas*, способные утилизировать СК [141]. Предполагалось, что эти бактерии снижают негативный эффект фенантрена и нафталина на рост растений. Штаммы *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia* sp. BS3702, деградирующие токсикант фенантрен и способные также утилизировать СК, были успешно использованы для снятия негативного эффекта фенантрена на растения горчицы [142]. Интересным представляется предложение использовать деструктор нафталина и фенантрена *P. fluorescens* A1 для защиты растений от фитопатогенов в условиях загрязненных почв [143]. Однако в этих исследованиях [22, 141–143] возможность влияния бактерий на растения в качестве деструкторов СК не изучалась. Эндوفитные штаммы *Ac. xylooxidans* SF2, *B. pumilus* SF3 и SF4, выделенные из корней подсолнечника [144], снижали концентрацию СК в побегах при дефиците влаги [145]. У растений *Citrus macrophylla*, инокулированных рост-стимулирующими ризобактериями *P. putida* KT2440 или *Novosphingobium* sp. HR1a наблюдалось снижение уровня СК в условиях солевого стресса [146]. Авторы предполагают, что положительный эффект на устойчивость к стрессам связан с модуляцией гормонального статуса растений, но информация об утилизации СК этими бактериями не представлена [145, 146].

Поскольку СК является ключевым защитным гормоном, обеспечивающим устойчивость растений к фитопатогенам, последние выработали механизмы деструкции этого вещества. Транскриптомное профилирование и результаты прямого ингибирования показали, что СК токсична для возбудителя бактериального увядания *Ralstonia solanacearum* и бактерии защищают себя путем ее деградации [147]. Более того, повышенная экспрессия генов деградации СК у штамма *R. sola-*

Таблица 2. Микроорганизмы-деструкторы салициловой кислоты

Название микроорганизма	Происхождение штамма	Дизайн и методы исследований	Основная функция микроорганизма	Источник
Бактерии				
<i>Achromobacter</i> sp. AB2	Почва Антарктики	Периодическая культура на селективной среде с СК	н.о.*	[22]
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> SOLR10	Ризосфера <i>Solana-ceae</i> , Бразилия	Периодическая культура на селективной среде с СК	н.о.	[22]
<i>Arthrobacter</i> spp.	Поверхность листьев деревьев	Периодическая культура на селективной среде с СК	Деструкторы фенантрена и нафталина	[141]
<i>Burkholderia</i> sp. 4A, 3B, 7B, 8B, AK, BS3702	Почвы Западной Сибири и Московской обл	ПЦР катаболических генов <i>nahAc</i> , <i>nahG</i> , <i>nahH</i> , <i>catA</i> и <i>phnAc</i>	Утилизация нафталина и фенантрена	[198]
<i>Burkholderia</i> sp. TRE3	Почва, Бразилия	Периодическая культура на селективной среде с СК	н.о.	[22]
<i>Lignobacter</i> sp. K17	Почва, гниющие опилки, Хельсинки	Периодическая культура, тонкослойная и газовая хроматография	Деструктор лигнанов, продуцент изованилиновой кислоты	[199]
<i>Martelella</i> sp. AD-3	Засоленная и загрязненная нефтью почва, Китай	Периодическая культура на селективной среде с СК, газовая хроматография и масс-спектрометрия, детекция меченых C ¹⁴ метаболитов	Изолирован для изучения механизмов деградации фенантрена	[200]
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> OV17	Ризосфера овса, Западная Сибирь	Периодическая культура, селективная среда с СК, активность салицилат гидроксилазы	Деструктор полиароматических углеводов	[201]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A1 и IC7	Ризосфера растений Московской и Тюменской областей	Периодическая культура на селективной среде с СК, обнаружение генов, контролирующих биодеградацию нафталина, фенантрена и салицилата	Биоконтроль фитопатогенов, фиторемедиация	[143]
<i>Pseudomonas</i> spp.	Почва, Московская область	Молекулярные методы, ПЦР, обнаружение гена салицилат 1-гидроксилазы <i>nahU</i> типа pND6-1	Деструктор капролактама	[140]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Почва	Периодическая культура на селективной среде с СК	Деструктор гидроксибензойных кислот	[130]
<i>Pseudomonas putida</i> PpG7 O13-O18, O111-O126.	Почвы, загрязненные нефтепродуктами, г. Пушкино	Периодическая культура на селективной среде с СК, молекулярные методы, характеристика гена салицилат гидроксилазы <i>nahU</i>	Потенциальные деструкторы СК	[202]
<i>Pseudomonas reinekei</i> MT1	Отложения реки Эльба, Германия	Локализация и секвенирование генов, кодирующих деградацию СК и производных, детекция метаболитов СК методами ВЭЖХ	Деструктор ароматических углеводов	[203]
<i>Pseudomonas</i> spp.	Поверхность листьев древесных растений	Периодическая культура на селективной среде с СК	Деструкторы фенантрена и нафталина.	[141]
<i>Pseudomonas</i> sp. PLMAX	Почва, Португалия	Периодическая культура на селективной среде с СК	н.о.	[22]

Таблица 2. Продолжение

Название микроорганизма	Происхождение штамма	Дизайн и методы исследований	Основная функция микроорганизма	Источник
<i>Ralstonia</i> sp. U2	Нефтезагрязненная почва, Венесуэла	Периодическая культура на селективной среде с СК, определение метаболитов методами тонкослойной хроматографии масс-спектрометрии	Деструктор нафталина	[150]
<i>Rhodococcus opacus</i> (ранее - <i>Nocardia</i> sp. DSM 43251)	Почва	Периодическая культура на селективной среде с СК, тонкослойная хроматография, детекция меченых C^{14} метаболитов	Биодеградация ксенобиотиков	[204]
<i>Rhodococcus</i> sp. B4	Почва, загрязненная ароматическими углеводородами	Детекция ароматических соединений методами ВЭЖХ, активность салицилат-5-гидроксилазы и салицилальдегид дегидрогеназы	Деструктор нафталина	[205]
<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	Почва, загрязненная ароматическими углеводородами	Периодическая культура на селективной среде с СК, анализ продуктов методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии	Деструктор полициклических ароматических углеводородов	[137]
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	Поверхность листьев древесных растений	Периодическая культура на селективной среде с СК	Деструкторы фенантрена и нафталина	[141]
<i>Stenotrophomonas</i> sp. Pemsol	Почва, загрязненная сырой нефтью, Мексика	Анализ продуктов деструкции ароматических углеводородов методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии, секвенирование и активность салицилат дегидрогеназы, салицилат 5-гидроксилазы и катехол 2,3-диоксигеназы	Деструктор антрахинона, бифенила, нафталина, фенантрена, фенантридина и ксилола	[206]
<i>Streptomyces</i> sp. WA46 и WA18.	Почва штата Огайо, США	Периодическая культура на селективной среде с СК, идентификация генов утилизации СК молекулярными методами	Объект изучения механизмов метаболизма СК	[139]
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	Поверхность листьев древесных растений	Периодическая культура на селективной среде с СК	Деструкторы фенантрена и нафталина	[141]
Грибы				
<i>Aspergillus niger</i>	н.о.	Периодическая культура на селективной среде с СК. образование 2,4-дигидробензоата	н.о.	[207]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Поверхность листьев древесных растений.	Периодическая культура на селективной среде с СК	Потенциальный продуцент полисахаридов и ферментов	[141]
<i>Neurospora crassa</i>	Почва	Восстановление СК до салицилового альдегида посредством НАДФН-зависимой оксидоредуктазы	Объект изучения механизмов метаболизма ароматических соединений	[157]

Таблица 2. Окончание

Название микроорганизма	Происхождение штамма	Дизайн и методы исследований	Основная функция микроорганизма	Источник
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Почва	Периодическая культура на селективной среде с СК, распределительная хроматография и радиоавтография ароматических кислот, очистка салицилат гидроксисилазы и гидроксифинол 1,2-диоксигеназы методами ВЭЖХ	Деструктор ароматических кислот	[152]

* н.о. — не описано.

nasearum К60 увеличивала его вирулентность для растений табака [147]. Механизм этого эффекта не раскрыт и варьирует в зависимости от растения-хозяина [148]. Геном штамма *R. solanacearum* содержит локус, состоящий из семи генов *nag* (naphthalene through gentisate) *nagAaGHAbIKL*, кодирующий деградацию СК до промежуточных продуктов цикла Кребса по пути Nag [149, 150]. На этом пути СК катаболизируется через промежуточное фенольное соединение гентизиновую кислоту [149]. Этот механизм защищает *R. solanacearum* от токсичности СК, в то время как гентизиновая кислота не является высокотоксичной для фитопатогена [147]. Гентизиновая кислота также относится к защитным сигнальным молекулам и активно накапливается в томатах [151]. Однако её роль в защитных реакциях табака существенно ниже по сравнению с СК, которая в табаке накапливается в достаточном для подавления роста бактерий количестве [147].

У почвенных дрожжей *Trichosporon cutaneum* был обнаружен фермент салицилат-1-монооксигеназа, который способствовал превращению СК в катехол [152]. Этот организм описан как деструктор многих ароматических углеводов, в том числе гентизиновой кислоты. Гемибиотрофный гриб *Aspergillus flavus* [153] содержит салицилатгидроксисилазу (*SalOH*), которая активно превращает СК в катехол. Ген салицилатгидроксисилазы *FgNahG* был найден у *Fusarium graminearum*, его репрессия приводила к повышенной чувствительности гриба к СК, увеличению накопления СК в колосьях пшеницы и подавлению развития симптомов фузариоза [128]. Ранее считалось, что дрожжи и мицелиальные грибы осуществляют катаболизм СК посредством действия салицилатгидроксисилазы и последующего расщепления ароматического кольца катехол-1,2-диоксигеназой с образованием муконата [154], в то время как активность катехол-2,3-диоксигеназы наблюдается у бактерий [154]. Затем появилась информация о существовании по крайней мере четырех способов метаболизма СК грибами, три из которых осуществляются благодаря гидроксисилазной ак-

тивности [155]. Помимо преобразования грибами СК в катехол, также возможно гидроксирование с образованием 2,4-дигидроксibenзоата при действии 2-гидроксibenзоат-4-гидроксисилазы, гидроксирование с образованием 2,5-дигидроксibenзоата посредством 2-гидроксibenзоат-5-гидроксисилазы, а также гидроксирование ферментом 2-гидроксibenзоат-3-гидроксисилазы с образованием 2,3-дигидроксibenзоата. Данные реакции не являются видо- или родоспецифичными для микроорганизмов. Дрожжи *Trichosporon moniliiforme* первоначально декарбоксилируют СК, образуя фенол в качестве промежуточного продукта [156]. Гриб *Neurospora crassa* не окисляет СК до катехола или гентизата, но восстанавливает до салицилового альдегида и салигенина [157].

Деструкция СК с образованием катехола была описана у фитопатогенных грибов *Sclerotinia sclerotiorum* [158] и *Ustilago maydis* [159]. У *U. maydis* был обнаружен рецептор Rss1, который является главным компонентом восприятия СК в сапрофитной стадии жизни гриба, но не оказывает влияния на вирулентность [160]. У гемибиотрофного гриба *Mycosphaerella fijiensis*, патогена бананов, гены салицилатгидроксисилазы активировались вместе с генами, ответственными за патогенез [161]. Салицилатгидроксисилаза и катехол-1,2-диоксигеназа *Fusarium* sp. VI индуцировались во время роста на СК, что указывало на образование катехола с последующим орто-расщеплением ароматического кольца [162]. Экспрессия генов, кодирующих салицилатгидроксисилазу, тирозиназу, гомогентизатдиоксигеназу и фумарилацетоацетатгидролазу в присутствии растения-хозяина (виноград) указывало на способность гриба *Lasioidiplodia theobromae* метаболизировать СК и ее предшественников фенилпропаноидного пути [163].

При заражении пшеницы *F. graminearum* колосья накапливали СК, но применение экзогенной СК не повышало устойчивость растений к фитопатогену благодаря его способности метаболизировать и экспортировать этот фитогормон [164]. Экспорт СК грибом осуществлялся с помощью белка ABC-транспортера FgABC9, необходимо-

го также для защиты от фунгицида тебуконазола и роста мицелия [165]. Добавление СК ингибировало продуцирование грибом микотоксина деоксиниваленола, но эффект проявлялся только в кислой среде, в то время как в обычных условиях *F. graminearum* утилизировал СК как источник углерода [164]. Недавно у *F. graminearum* была выявлена салицилатгидроксилаза FgShy1, и показано ее участие в метаболизме СК до катехола с помощью мутантов с делецией в гене *FgShy1* [166].

Накопленная информация свидетельствует о том, что роль СК-утилизирующих микроорганизмов, особенно фитопатогенных, в процессах роста и адаптации к стрессам значительна и требует более детального изучения.

Абсцизовая кислота. Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) важна для многих аспектов роста и развития растений, в том числе для прорастания и созревания семян, регуляции газообмена в листьях, инициации адаптивных изменений под влиянием абиотических стрессов и сложной сети антагонистических и синергических взаимодействий с другими фитогормонами [167]. В растениях биосинтез АБК проходит путем окислительного расщепления каротиноидов 9-*цис*-виолаксантина или 9-*цис*-неоксантина до ксантоксина ферментами 9-*цис*-эпоксикаротиноиддиоксигеназами с последующим образованием абсцизового альдегида ксантоксиноксидазой, который конвертируется в АБК под действием абсцизового альдегидоксидазы [168]. Катаболизм АБК в растениях подразделяется на реакции гидроксирования и конъюгации [168]. При гидроксировании окисляется одна из трех метильных групп кольцевой структуры (С-7, С-8 или С-9) ферментами АБК-гидроксилазами. АБК и ее гидроксированные катаболиты могут конъюгировать с глюкозой. Одним из основных катаболитов АБК является фазеиновая кислота (ФК), которая трансформируется до дигидрофазеиновой кислоты и её глюкозида с помощью ФК-редуктазы и гликозилтрансферазы соответственно [169].

Способность продуцировать АБК распространена у фитопатогенных грибов [170, 171]. Предполагается, что такие фитопатогены используют АБК для нарушения гормонального статуса растений и ослабления механизмов защитного сигналинга. Бактерии также синтезируют АБК, но это свойство описано в основном у сапрофитных или рост-стимулирующих ризобактерий [5, 144, 172]. Однако роль бактериальной АБК в растительно-микробных взаимодействиях изучена недостаточно.

В 1983 г. Милборроу [173] обнаружил, что меченная ¹⁴С АБК трансформируется в почве с образованием 1,4-диола АБК. Было также найдено несколько меченых продуктов в бактериальных культурах, но ни один из них не был идентичен

метаболитам АБК высших растений. Быстрое снижение концентрации АБК, внесенной в нестерильную почву, свидетельствовало о биологической деструкции [174]. Почвенная бактерия *Corynebacterium* sp. 433-3-2 метаболизировала АБК с образованием дегидровомифолиола [(±)-1'-гидрокси-4'-кето-α-ионон] и обладала активностью вомифолиолдегидрогеназы [175]. Это позволило предположить, что вомифолиол является предшественником дегидровомифолиола на пути дегградации АБК. В 2014 г. из ризосферы риса были изолированы бактерии *Rhodococcus* sp. P1Y и *Novosphingobium* sp. P6W, способные использовать АБК в качестве единственного источника углерода и энергии [176]. В дальнейшем было доказано, что штамм *Rhodococcus* sp. P1Y образовывал два метаболита, одним из которых является дегидровомифолиол [177], а другим метаболитом было неописанное ранее соединение, которое изучается в настоящее время (неопубликованные данные). Эти результаты указывают на отличие бактериальных биохимических путей катаболизма АБК от растительных.

Способность утилизирующих АБК микроорганизмов снижать содержание этого фитогормона в растениях впервые была показана при инокуляции проростков томата и риса ризобактериями *Rhodococcus* sp. P1Y и *Novosphingobium* sp. P6W [176]. При этом штамм *Novosphingobium* sp. P6W ингибировал удлинение корней, но повышал биомассу листьев. Недавно установлено, что бактерия *Rhodococcus qingshengi* катаболизировала АБК, снижала её концентрацию в инокулированных растениях арабидопсиса и увеличивала накопление Cd, Zn и Ni в побегах [178]. Авторы предположили, что АБК-утилизирующие ризобактерии активизируют транспорт тяжелых металлов из корня в побег и их использование может повысить эффективность фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв [178]. При изучении биосинтеза АБК фитопатогенным грибом *Ceratocystis coerulea* Bakshi RWD390 с использованием изотопа ¹⁴С было установлено, что из [2-¹⁴С]-АБК он образовывал [2-¹⁴С]-*транс*-АБК и метаболит с меньшей полярностью, чем молекула субстрата [170]. Интересно, что ранее *транс*-изомер АБК также был обнаружен в культурах грибов *Cercospora rosicola* [179] и *Botrytis cinerea* [180]. Было высказано предположение, что образование *транс*-изомера происходит путем ферментативного фотолиза АБК [170].

Концентрация АБК и экспрессия генов биосинтеза АБК в растениях снижаются при инокуляции мутуалистическими микроорганизмами, у которых способность к утилизации данного фитогормона специально не изучалась. Ризобактерия *B. subtilis* GB03 увеличивала фотосинтетическую активность арабидопсиса за счет снижения

Таблица 3. Микроорганизмы-деструкторы абсцизовой кислоты

Название микроорганизма	Происхождение штамма	Дизайн и методы исследований	Основная функция микроорганизма	Источник
Бактерии				
<i>Corynebacterium</i> 433-3-2	Почва	Периодическое культивирование на среде с ¹⁴ C-АБК, жидкостная и тонкослойная хроматография, GC-MS анализ	н.о.*	[175]
<i>Novosphingobium</i> sp. P6W	Ризосфера риса, дерново-подзолистая почва, Санкт-Петербург	Периодическое культивирование на среде с АБК, радиоиммуноанализ с MAC252	Ризосферная бактерия деструктор АБК	[176]
<i>Rhodococcus qingshengi</i> BNCC203056	н.о.	Периодическое культивирование на среде с АБК, иммуноферментный анализ (ELISA)	Деструктор АБК	[178]
<i>Rhodococcus</i> sp. P1Y	Ризосфера риса, дерново-подзолистая почва, Санкт-Петербург	Периодическое культивирование на среде с АБК, радиоиммуноанализ с MAC252	Ризосферная бактерия деструктор АБК	[176]
Грибы				
<i>Ceratocystis coerulescens</i> Bakshi RWD390	Сосна, Колорадо, США	Периодическое культивирование на среде с ¹⁴ C-АБК, жидкостная и газовая хроматография	Фитопатогенный продуцент АБК	[170]

* н.о. — не описано.

транскрипции генов, участвующих в сигналинге АБК [181]. Инокуляция штаммом *B. megaterium* снижала концентрацию АБК и ингибировала рост дефицитных по биосинтезу данного фитогормона мутантов томата *flacca* и *sitiens*, но не оказывала негативных эффектов на растения дикого типа [182]. У инокулированных мутантов также повышался биосинтез этилена, что могло быть причиной ингибирования роста и свидетельствовало о важности поддержания нормального уровня эндогенной АБК для реализации рост-стимулирующего эффекта бактерий. Рост-стимулирующие ризобактерии *Burkholderia cepacia* SE4, *Promicromonospora* sp. SE188 и *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 снижали уровень АБК, но увеличивали концентрацию СК и гиббереллина GA₄ в растениях огурца в обычных условиях и при засухе [183]. Продуцент гиббереллинов *Promicromonospora* sp. SE188 оказывал благоприятное влияние на рост томата и значительно снижал биосинтез АБК [184]. Совместная инокуляция кукурузы азотфиксирующей бактерией *Azospirillum* sp. и эндомикоризным грибом *Glomus manihotis* снижала содержание АБК в растениях во время засухи [185]. Авторы предположили, что это было связано с улучшением водного и питательного статуса растений. У микоризованных растений оливы в условиях водного стресса содержание АБК в листьях было на 46%

меньше, чем у растений без микоризы [186]. Эндодитный стимулирующий рост гриб *Metarhizium anisopliae* LHL07 в условиях солевого стресса снижал содержание АБК в растениях сои более чем в 2 раза по сравнению с неинокулированным контролем [187]. Однако, эффект этих микроорганизмов мог быть связан с влиянием на биосинтез или функционирование растительной АБК в результате лучшей адаптации растений к стрессам за счет других механизмов. Об этом свидетельствует снижение концентрации АБК в растениях гороха [188] и томата [176], инокулированных штаммом *V. paradoxus* 5C-2, который продуцировал ИУК и АЦК-деаминазу [111], но не обладал способностью утилизировать АБК [176].

Результаты вышеупомянутых исследований показали, что АБК-утилизирующие ризобактерии способны влиять на концентрацию АБК *in planta* и рост растений (табл. 3). Представляется интересным изучить биоконтрольный эффект таких бактерий в отношении продуцирующих АБК фитопатогенов и их роль в устойчивости растений к абиотическим стрессам.

Жасмонаты. Жасмоновая кислота (ЖК) и ее биологически активные производные, называемые жасмонатами (метилжасмонат, *цис*-жасмон и др.), участвуют в процессах роста корней, развития пыльцы, клубнеобразования, созревания

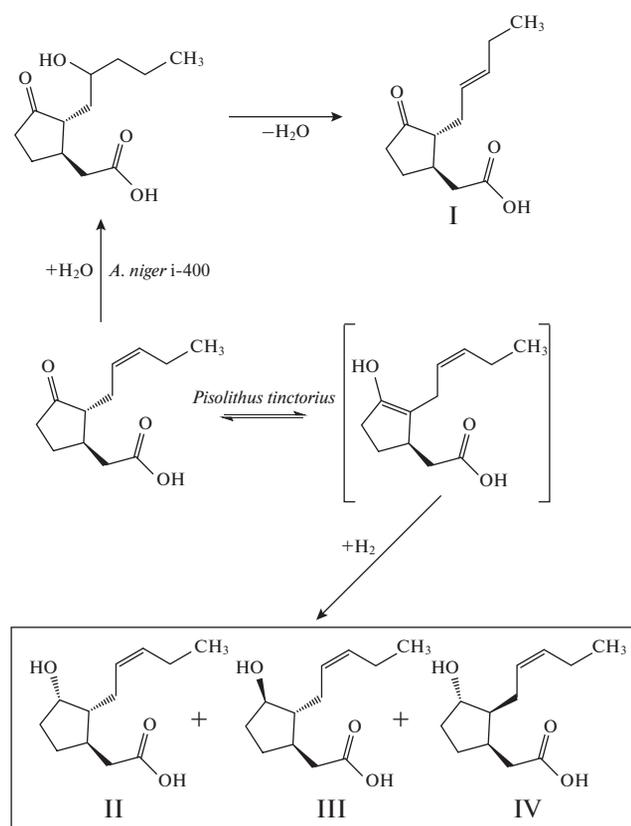


Рис. 1. Схема микробной трансформации жасмоновой кислоты до *транс*-жасмоновой кислоты (I) (штамм *Aspergillus niger* i-400), 7-изо-кукурбиновой (II), 6-эпи-7-изо-кукурбиновой (III) и кукурбиновой кислот (IV) (штамм *Pisolithus tinctorius*). Для создания рисунка использованы результаты, полученные в работах [192, 194].

плодов, старения, а также в реакциях на различные абиотические стрессовые факторы и устойчивость к патогенам и травоядным организмам [189]. Важный эффект ЖК заключается в индукции генов, которые кодируют ферменты биосинтеза вторичных метаболитов (алкалоидов, фитостероидов) при биотическом стрессе. Биосинтез ЖК в растениях подробно изучен и осуществляется из α -линоленовой кислоты на пути биосинтеза оксипинов [189].

Способность синтезировать ЖК и ее предшественник 12-оксо-фитодиеновую кислоту описана у рост-стимулирующих ризобактерий *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes* sp. и *Bacillus pumilus* [144]. Продукторы ЖК выявлены также среди сапрофитных и фитопатогенных грибов [190]. Однако, исследований в области микробного катаболизма ЖК и жасмонатов немного. Гидролитическая активность по отношению к метилжасмонату была показана у грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Talaromyces*, а также у бактерий родов *Streptomyces* и *Mycobacterium* [191]. При этом грибы и *Streptomyces*

henetus гидролизovali в основном [1S, 2S (Z)]-(+)-изомер, но *Mycobacterium phlei* преимущественно гидролизовал [1R, 2R (Z)]-(-)-изомер. Штамм *Aspergillus niger* ATCC 9142 при культивировании на метилжасмонате образовывал ЖК [191], а *A. niger* i-400 превращал ЖК через последовательные стадии гидроксирования и дегидроксилирования пентенильной боковой цепи (рис. 1) в *транс*-изомер (I) [192]. Гидроксирование пентенильной боковой цепи ЖК было также описано у фитопатогена *Botryodiplodia theobromae* [193] и эктомикоризного гриба *Pisolithus tinctorius* [194]. В культуральной жидкости *P. tinctorius* обнаружены 7-изо-кукурбиновая (II), 6-эпи-7-изо-кукурбиновая (III) и кукурбиновая кислоты (IV) (рис. 1). Такой набор метаболитов может быть обусловлен гидрированием двойной связи в енольной форме ЖК. Эти результаты свидетельствуют о способности ассоциированных с растениями микроорганизмов трансформировать ЖК и ее производные. Поэтому представляется весьма вероятным влияние этого свойства микроорганизмов на растения. В пользу этой гипотезы можно привести результаты инокуляции проростков подсолнечника штаммами *A. xylosoxidans* или *B. pumilus*, которая приводила к снижению концентрации ЖК [145].

* * *

Положительная роль фитогормонов мутуалистических бактерий и грибов в стимуляции роста и повышении устойчивости растений к стрессам детально освещена в литературе. Обсуждаются также способность фитопатогенов продуцировать фитогормоны и механизмы участия этого свойства в патогенезе, основанные на нарушении гормонального баланса и ослаблении защитных реакций растения. В то же время накапливается экспериментальный материал о способности микроорганизмов деструктировать и(или) трансформировать фитогормоны и их предшественники и утилизировать их в качестве источника питания. Эти свойства широко распространены в мире микроорганизмов и обнаружены у почвенных мутуалистических и фитопатогенных форм бактерий и грибов, а также проявляются по отношению ко всем классам фитогормонов. Наиболее изученными в этом отношении являются ауксины, СК и предшественник в биосинтезе этилена АЦК. Несмотря на достигнутый прогресс в исследовании биохимических механизмов микробной деградации этих веществ, роль данного феномена в функционировании фитогормонов и регуляции взаимодействия микробов с растениями требует более детального изучения с привлечением современных молекулярно-генетических методов. Интригующими остаются вопросы о том, почему способностью утилизировать фитогормоны обла-

дают как полезные, так и фитопатогенные микроорганизмы и каким образом эти микроорганизмы используют данное свойство в образовании мутуалистических симбиосистем и патосистем. Значение данных процессов для экологии симбиотических микроорганизмов и микробных взаимодействий в основном остается на уровне теоретических предположений и гипотез. Представляется особенно интересным изучить (1) роль симбиотических микроорганизмов, утилизирующих СК и АБК, в процессах роста и адаптации растений к стрессам, (2) биоконтрольный эффект АБК-утилизирующих бактерий в отношении продуцирующих АБК фитопатогенов, (3) роль АЦК-утилизирующих грибов в патогенезе, (4) значение одновременной способности утилизировать и продуцировать фитогормоны для микробной модуляции гормонального статуса растений. Раскрытие механизмов модуляции концентраций фитогормонов в растениях симбиотическими и патогенными микроорганизмами поможет дать ответы на многие противоречивые наблюдения о функционировании растительно-микробных систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 20-116-50140). Сырова Д.С. и Шапошников А.И. внесли одинаковый вклад в подготовку данного обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Veselov D.S., Veselov S.Yu., Vysotskaya L.B., Kudryanova G.P., Farxutdinov P.G.* Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом. М.: Наука, 2007. 158 с.
2. *Davies P.J.* Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Heidelberg, Netherlands: Springer, 2010. 802 p.
3. *Tran L.-S., Pal S.* Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications. N.Y.: Springer-Verlag, 2014. 361 p.
4. *Frankenberger W.T., Arshad M.* Phytohormones in Soil: Microbial Production and Function. N.Y.: Marcel Dekker, 1995. 503 p.
5. *Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A.* // Ann. Appl. Biol. 2010. V. 157. № 3. P. 361–379.
6. *Spaepen S.* // Principles of Plant-microbe Interactions. /Ed. B. Lugtenberg. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 247–256.
7. *de-Bashan L.E., Hernandez J.-P., Bashan Y.* // Appl. Soil Ecol. 2012. V. 61. P. 171–189.
8. *Egamberdieva D., Wirth S.J., Alqarawi A.A., Abd Allah E.F., Hashem A.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Article 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
9. *Chanclud E., Morel J.B.* // Mol. Plant Pathol. 2016. V. 17. № 8. P. 1289–1297.
10. *Patkar R.N., Naqvi N.I.* // PLoS Pathog. 2017. V. 13. № 6. e1006334. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006334>
11. *Shen Q., Liu Y., Naqvi N.I.* // Curr. Opin. Microbiol. 2018. V. 46. P. 1–6.
12. *Han X., Kahmann R.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article 822. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00822>
13. *Teale W.D., Paponov I.A., Palme K.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. V. 7. № 11. P. 847–859.
14. *Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Непрусов Л.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 133–143.
15. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.* // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. № 4. P. 425–448.
16. *Patten C.L., Blakney A.J., Coulson T.J.* // Crit. Rev. Microbiol. 2013. V. 39. № 4. P. 395–415.
17. *Laird T.S., Flores N., Leveau J.H.J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. № 22. P. 9535–9550.
18. *Parker-Rhodes A.F.* // J. Agric. Sci. 1940. V. 30. P. 654–671.
19. *Strzelczyk E., Karwowska J.M.* // Pol. J. Soil Sci. 1969. V. 2. P. 59–64.
20. *Kampert M., Sitek J.M., Strzelczyk E.* // Pol. J. Soil Sci. 1972. V. 5. P. 53–57.
21. *Claus G., Kutzner H.J.* // System Appl. Microbiol. 1983. V. 4. № 2. P. 169–180.
22. *Nascimento F.X., Glick B.R., Rossi M.* // Access Microbiol. 2019. V. 1. № 7. e000053. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000053>
23. *Crozier A., Arruda P., Jasmin J.M., Monteiro A.M., Sandberg G.* // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 11. P. 2833–2837.
24. *Leveau J.H.J., Gerards S.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 65. № 2. P. 238–250.
25. *Leveau J.H.J., Lindow S.E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 5. P. 2365–2371.
26. *Egebo L.A., Nielsen S.V., Jochimsen B.U.* // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 15. P. 4897–4901.
27. *Rigaud J., Puppo A.* // Microbiology. 1975. V. 88. P. 223–228.
28. *Dullaart J.* // Acta Bot. Neerl. 1970. V. 19. № 5. P. 573–615.
29. *Ernstsen A., Sandberg G., Crozier A., Wheeler C.T.* // Planta. 1987. V. 171. № 3. P. 422–428.
30. *Zúñiga A., Poupin M.J., Donoso R., Ledger T., Guiliani N., Gutiérrez R.A., González B.* // Mol. Plant Microbe Interact. 2013. V. 26. № 5. P. 546–553.
31. *Torres D., Benavidez I., Donadio F., Mongiardini E., Rosas S., Spaepen S., Vanderleyden J., Pěňčík A., Novák O., Strnad M., Frébortová J., Cassán F.* // Res. Microbiol. 2018. V. 169. № 6. P. 313–323.
32. *Lubbers R.J.M., Dilokpimol A., Visser J., Mäkelä M.R., Hildén K.S., de Vries R.P.* // Biotechnol. Adv. 2019. V. 37. Article 107396. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.002>
33. *Deslandes B., Gariépy C., Houde A.* // Livestock Production Sci. 2001. V. 71. № 2. P. 193–200.

34. Donoso R., Leiva-Novoa P., Zúñiga A., Timmermann T., Recabarren-Gajardo G., González B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83. № 1. e01991-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.01991-16>
35. Sadauskas M., Statkevičiūtė R., Vaitekūnas J., Meškys R. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 4. Article 663. <https://doi.org/10.3390/biom10040663>
36. Harwood C.S., Parales R.E. // *Ann. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 553–590.
37. Lin H.-R., Shu H.-Y., Lin G.-H. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 216. P. 30–39.
38. Jensen J.B., Egsgaard H., Van Onckelen H., Jochimsen B.U. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 20. P. 5762–5766.
39. Tsubokura S., Sakamoto Y., Ichihara K. // *J. Biochem.* 1961. V. 49. № 1. P. 38–42.
40. Schühle K., Nies J., Heider J. // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. № 9. P. 3120–3132.
41. Ebenau-Jehle C., Thomas M., Scharf G., Kockelkorn D., Knapp B., Schühle K., Heider J., Fuchs G. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. № 11. P. 2894–2903.
42. Aklujkar M., Rizzo C., Smith J., Beaulieu D., Dubay R., Giloteaux L., DiBurro K., Holmes D. // *Microbiology.* 2014. V. 160. № 12. P. 2694–2709.
43. Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. № 9. P. 2541–2555.
44. Seidel C., Walz A., Park S., Cohen J.D., Ludwig-Muller J. // *Plant Biol.* 2006. V. 8. № 3. P. 340–345.
45. Tabone J., Tabone D. Bio-estérification du Glucose. V. // *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1953. V. 237. № 16. P. 943–944.
46. Mahadevan A. *Growth Regulators, Microorganisms and Diseased Plants.* New Delhi: Oxford & IBH, 1984. 466 p.
47. Hutzinger O., Kosuge T. // *Biochemistry.* 1968. V. 7. № 2. P. 601–605.
48. Comai L., Kosuge T. // *J. Bacteriol.* 1980. V. 143. № 2. P. 950–957.
49. Yoshida N., Sassa T. // *Agric. Bioi. Chern.* 1990. V. 54. № 10. P. 2681–2687.
50. Teusher G., Teuscher E. // *Phytochemistry.* 1965. V. 4. № 3. P. 511–515.
51. Дворникова Т.П., Скрябин Г.К., Суворов Н.Н. // *Микробиология.* 1970. Т. 39. № 1. С. 42–46.
52. Ray P.M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1956. V. 64. № 1. P. 193–216.
53. Krupasagar V., Sequeira L. // *Am. J. Bot.* 1969. V. 56. P. 390–397.
54. Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Article 1368. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368>
55. Hirsch A.M., Bhuvaneshwari T.V., Torrey J.G., Bisseling T. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. V. 86. № 4. P. 1244–1248.
56. Boot K.J.M., van Brussel A.A.N., Tak T., Spalink H.P., Kijne J.W. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1999. V. 12. № 10. P. 839–844.
57. Dhungana S.A., Itoh K. // *Horticulturae.* 2019. V. 5. № 1. Article 17. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010017>
58. Pencík A., Simonovik B., Petersson S.V., Henyková E., Simon S., Greenham K., Zhang Y., Kowalczyk M., Estelle M., Zazimalová E., Novák O., Sandberg G., Ljung K. // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 3858–3870.
59. Bömke C., Tudzynski B. // *Phytochemistry.* 2009. V. 70. № 15–16. P. 1876–1893.
60. Yamaguchi S. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 225–251.
61. Bottini R., Cassán F., Piccoli P. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. № 5. P. 497–503.
62. Salazar-Cerezo S., Martínez-Montiel N., García-Sánchez J., Pérez-y-Terrón R., Martínez-Contreras R.D. // *Microbiol. Res.* 2018. V. 208. P. 85–98.
63. Hedden P., Sponsel V. // *J. Plant Growth Regul.* 2015. V. 34. № 4. P. 740–760.
64. Piccoli P., Bottini R. // *Symbiosis.* 1994. V. 17. P. 229–236.
65. Piccoli P., Lucangeli D., Schneider G., Bottini R. // *Plant Growth Regul.* 1997. V. 23. P. 179–182.
66. Piccoli P., Masciarelli O., Bottini R. // *Symbiosis.* 1996. V. 21. P. 167–178.
67. Cassán F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P. // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. № 4. P. 2053–2058.
68. McAdam E.L., Reid J.B., Foo E. // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. № 8. P. 2117–2130.
69. Heck C., Kuhn H., Heidt S., Walter S., Rieger N., Requena N. // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. № 20. P. 2770–2778.
70. Kieber J.J., Schaller G.E. // *The Arabidopsis Book.* 2014. V. 12. e0168. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
71. Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 2431–2452.
72. Trdá L., Barešová M., Šašek V., Nováková M., Zahajská L., Dobrev P.I., Motyka V., Burketová L. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 1374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01374>
73. Großkinsky D.K., Tafner R., Moreno M.V., Stenglein S.A., García de Salamone I.E., Nelson L.M., Novák O., Strnad M., van der Graaff E., Roitsch T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Article 23310. <https://doi.org/10.1038/srep23310>
74. Timmusk S., Nicander B., Granhall U., Tillberg E. // *Soil Biol. Biochem.* 1999. V. 31. P. 1847–1852.
75. Taylor J.L., Zaharia L.I., Chen H., Anderson E., Abrams S.R. // *Phytochemistry.* 2006. V. 67. P. 1887–1894.
76. Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuszka P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmölling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vermecke D. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2010. V. 23. № 9. P. 1164–1174.
77. Joshi M.V., Loria R. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007. V. 20. № 7. P. 751–758.

78. *Gamas P., Brault M., Jardinaud M.F., Frugier F.* // *Trend. Plant Sci.* 2017. V. 22. № 9. P. 792–802.
79. *Liao D., Wang S., Cui M., Liu J., Chen A., Xu G.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 10. Article. 3146. <https://doi.org/10.3390/ijms19103146>
80. *Kazan K., Lyons R.* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. № 6. P. 2285–2309.
81. *Boivin S., Fonouni-Farde C., Frugier F.* // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 1240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01240>
82. *Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U., Martynenko E.V., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R.* // *Plant Soil.* 2007. V. 292. P. 305–315.
83. *Dolgikh E.A., Shaposhnikov A.I., Dolgikh A.V., Gribchenko E.S., Bodyagina K.B., Yuzhikhin O.S., Tikhonovich I.A.* // *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* 2017. V. 9. № 3. P. 22–35.
84. *Pirttilä A.M., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A.* // *Physiol. Plant.* 2004. V. 121. № 2. P. 305–312.
85. *Madhaiyan M., Poonguzhali S., Ryu J., Sa T.* // *Planta.* 2006. V. 224. № 2. P. 268–278.
86. *Mathesius U., Charon C., Rolfé B.G., Kondorosi A., Crespi M.* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. V. 13. № 6. P. 617–628.
87. *Heckmann A.B., Sandal N., Bek A.S., Madsen L.H., Jurkiewicz A., Nielsen M.W., Tirichine L., Stougaard J.* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011. V. 24. P. 1385–1395.
88. *Miri M., Janakirama P., Held M., Ross L., Szczyglowski K.* // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. P. 178–186.
89. *Cosme M., Wurst S.* // *Soil Biol. Biochem.* 2013. V. 57. P. 436–443.
90. *Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р.* // *Физиология растений.* 2006. Т. 53. № 4. С. 567–574.
91. *Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E.* *Ethylene in Plant Biology.* N.Y.: Acad. Press, 1992. 414 p.
92. *Qin H., He L., Huang R.* // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Article 874. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00874>
93. *Iqbal N., Khan N.A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A., Khan M.I.R.* // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. Article. 475. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
94. *Wang F., Cui X., Sun Y., Dong C.H.* // *Plant Cell Rep.* 2013. V. 32. № 7. P. 1099–1109.
95. *Gamalerio E., Glick B.R.* // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. № 1. P. 13–22.
96. *Pattyn J., Vaughan-Hirsch J., Van de Poel B.* // *New Phytol.* 2021. V. 229. № 2. P. 770–782.
97. *Fukuda H., Ogawa T., Tanase S.* // *Adv. Microb. Physiol.* 1993. V. 35. P. 275–306.
98. *De Bont J.A.M.* // *Ann. Appl. Biol.* 1975. V. 81. № 1. P. 119–121.
99. *De Bont J.A.M., Attwood M.M., Primrose S.B., Harder W.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1979. V. 6. № 3. P. 183–188.
100. *Abeles F.B.* // *J. Plant Growth Regul.* 1984. V. 3. № 1. P. 85–95.
101. *Danko A.S., Freedman D.L.* // *Proc. Biochem.* 2008. V. 43. № 5. P. 517–521.
102. *Saeki H., Akira M., Furuhashi K., Averhoff B., Gottschalk G.* // *Microbiology.* 1999. V. 145. № 7. P. 1721–1730.
103. *Koene-Cottaar F.H., Schraa G.* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1998. V. 25. № 3. P. 251–256.
104. *Shennan J.L.* // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006. V. 81. № 3. P. 237–256.
105. *Kim J.* // *J. Hazard. Mater.* 2006. V. 131. № 1–3. P. 131–136.
106. *Van Ginkel C.G., Welten H.G.J., De Bont J.A.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. № 12. P. 2903–2907.
107. *Fu Y., Shao L., Liu H., Tong L., Liu H.* // *J. Hazard. Mater.* 2011. V. 192. № 2. P. 658–666.
108. *Ravanbakhsh M., Sasidharan R., Voeselek L.A., Kowalchuk G.A., Jousset A.* // *Microbiome.* 2018. V. 6. № 1. P. 1–10.
109. *Honma M., Shimomura T.* // *Agric. Biol. Chem.* 1978. V. 42. № 10. P. 1825–1831.
110. *Glick B.R., Penrose D.M., Li J.* // *J. Theor. Biol.* 1998. V. 190. № 1. P. 63–68.
111. *Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., Glick B.R.* // *Soil Biol. Biochem.* 2005. V. 37. № 2. P. 241–250.
112. *Белимов А.А., Сафронова, В.И.* // *Сельскохозяйственная биология.* 2011. Т. 46. № 3. С. 23–29.
113. *Nascimento F.X., Rossi M.J., Soares C.R., McConkey B.J., Glick B.R.* // *PloS One.* 2014. V. 9. №6. e99168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099168>
114. *Gupta S., Pandey S.* // *Plant Gene.* 2019. V. 18. Article 100175. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100175>
115. *Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.-J., Stepanok V.V.* // *Can. J. Microbiol.* 2001. V. 47. № 7. P. 642–652.
116. *Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T.* // *Planta.* 2007. V. 226. № 4. P. 867–876.
117. *Ma W., Sebastianova S.B., Sebastian J., Burd G.I., Guinel F.C., Glick B.R.* // *Anthony van Leeuwenhoek.* 2003. V. 83. № 3. P. 285–291.
118. *Duan J., Müller K.M., Charles T.C., Vesely S., Glick B.R.* // *Microb. Ecol.* 2009. V. 57. № 3. P. 423–436.
119. *Belimov A.A., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Litvinsky V.A., Nosikov V.V., Zavalin A.A., Tikhonovich I.A.* // *Environ. Exp. Bot.* 2019. V. 167. Article 103859. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103859>
120. *Hontzeas N., Richardson A.O., Belimov A.A., Safronova V.I., Abu-Omar M.M., Glick B.R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 7556–7558.
121. *Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzeas N., Davies W.J.* // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 6. P. 1485–1495.

122. Никонов И.Н., Ячиновский И.С., Сафронова В.И., Белимов А.А. // Современная микология в России. Материалы 2-го съезда микологов России. Москва: Национальная академия микологии, 2008. С. 136.
123. Saravanakumar K., MubarakAli D., Kathiresan K., Wang M.H. // Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci. 2018. V. 7. № 4. P. 446–451.
124. Rauf M., Awais M., Ud-Din A., Ali K., Gul H., Rahman M.M., Hamayun M., Arif M. // Front. Plant Sci. 2021. V. 11. Article 614971. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614971>
125. Xie Y., Li X., Huang X., Han S., Amombo E., Wassie M., Chen L., Fu J. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 171. P. 373–381.
126. Galeano M., Franco D., Chaves P., Giannesi G., Masui D., Ruller R., Corrêa B., Brasil M., Zanoelo F. // Rhizosphere. 2021. V. 18. Article 100332. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100332>
127. Salicylic Acid – a Plant Hormone. / Eds. Hayat S., Ahmad A. Springer Netherlands, 2007. 401 p.
128. Qi P.F., Zhang Y.Z., Liu C.H., Chen Q., Guo Z.R., Wang Y., Xu B.J., Jiang Y.F., Zheng T., Gong X., Luo C.H., Wu W., Kong L., Deng M., Ma J., Lan X.J., Jiang Q.T., Wei Y.M., Wang J.R., Zheng Y.L. // Toxins. 2019. V. 11. № 2. Article 59. <https://doi.org/10.3390/toxins11020059>
129. Lebeis S.L., Paredes S.H., Lundberg D.S., Breakfield N., Gehring J., McDonald M., Malfatti S., Glavina del Rio T., Jones C.D., Tringe S.G., Dangl J. L. // Science. 2015. V. 349. № 6250. P. 860–864.
130. Walker N., Evans W.C. // Biochem. J. 1952. V. 52. № 4. P. xv–xxxiv.
131. Katagiri M., Yamamoto S., Hayaishi O. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 2413–2414.
132. Ohta S., Matsumoto H., Terawaki Y. // Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 41. № 1. P. 312–314.
133. Filonov A.E., Karpov A.V., Kosheleva I.A., Puntus I.F., Balashova N.V., Boronin A.M. // Proc. Biochem. 2000. V. 35. № 9. P. 983–987.
134. Плотникова Е.Г., Алтынцева О.В., Кошелева И.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Гавриш Е.Ю., Демаков В.А., Боронин А.М. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 1. P. 61–69.
135. Pozdnyakova-Filatova I., Petrikov K., Vetrova A., Frolova A., Streletskii R., Zakharova M. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Article 1217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01217>
136. Kesseru P., Kiss I., Bihari Z., Pál K., Portörő P., Polyák B. // Bioresour. Technol. 2005. V. 96. № 7. P. 779–784.
137. Jouanneau Y., Micoud J., Meyer C. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 23. P. 7515–7521.
138. Matera I., Ferraroni M., Bürger S., Scozzafava A., Stolz A., Briganti F. // J. Mol. Biol. 2008. V. 380. № 5. P. 856–868.
139. Ishiyama D., Vujaklija D., Davies J. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 3. P. 1297–1306.
140. Панов А.В., Волкова О.В., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Кошелева И.А., Боронин А.М. // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 116–123.
141. Сазонова О.И., Соколов С.Л., Присяжная Н.В., Измалкова Т.Ю., Кошелева И.А., Боронин А.М. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 72–79.
142. Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 4. С. 484–490.
143. Суцова Т.В., Анохина Т.О., Сизова О.И., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Кочетков В.В., Боронин А.М. // Биотехнология. 2017. Т. 33. № 1. С. 56–67.
144. Forchetti G., Masciarelli O., Alemanno S., Alvarez D., Abdala G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. № 5. P. 1145–1152.
145. Castillo P., Escalante M., Gallardo M., Alemanno S., Abdala G. // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. № 7. P. 2299–2309.
146. Vives-Peris V., Gómez-Cadenas A., Pérez-Clemente R.M. // Plant Cell Rep. 2018. V. 37. № 11. P. 1557–1569.
147. Lowe-Power T.M., Jacobs J.M., Ailloud F., Fochs B., Prior P., Allen C. // MBio. 2016. V. 7. № 3. e00656-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00656-16>
148. Allen C., Prior P., Hayward A.C. Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. / Ed. A.C. Hayward. Saint Paul: APS Press, 2005. 510 p.
149. Fuenmayor S.L., Wild M., Boyes A.L., Williams P.A. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 9. P. 2522–2530.
150. Zhou N.Y., Al-Dulayymi J., Baird M.S., Williams P.A. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 6. P. 1547–1555.
151. Jacobs J.M., Milling A., Mitra R.M., Ailloud F., Prior P., Allen C. // MBio. 2013. V. 4. № 6. e00875-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00875-13>
152. Sze I.S., Dagley S. // J. Bacteriol. 1984. V. 159. № 1. P. 353–359.
153. Guo B.Z., Butrón A., Li H., Widstrom N.W., Lynch R.E. // J. Food Prot. 2002. V. 65. № 1. P. 167–171.
154. Shailubhai K., Rao N.N., Modi V.V. // Indian J. Exp. Biol. 1982. V. 20. № 2. P. 166–168.
155. Wright J.D. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 9. № 1. P. 9–16.
156. Iwasaki Y., Gunji H., Kino K., Hattori T., Ishii Y., Kirimura K. // Biodegradation. 2010. V. 21. № 4. P. 557–564.
157. Gross G.G., Zenk M.H. // Eur. J. Biochem. 1969. V. 8. № 3. P. 420–425.
158. Penn C.D., Daniel S.L. // Curr. Microbiol. 2013. V. 67. № 2. P. 218–225.
159. Rabe F., Ajami-Rashidi Z., Doehlemann G., Kahmann R., Djamei A. // Mol. Microbiol. 2013. V. 89. № 1. P. 179–188.
160. Rabe F., Seitner D., Bauer L., Navarrete F., Czedik-Eysenberg A., Rabanal F.A., Djamei A. // Mol. Microbiol. 2016. V. 102. № 2. P. 290–305.
161. Noar R.D., Daub M.E. // BMC Genomics. 2016. V. 17. № 1. P. 1–17.
162. Dodge A.G., Wackett L.P. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 2. P. 876–882.
163. Gonçalves M., Nunes R., Tilleman L., Van de Peer Y., Deforme D., Van Nieuwerburgh F., Alves A. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 23. P. 6083–6083.

164. Qi P.F., Johnston A., Balcerzak M., Rocheleau H., Harris L.J., Long X.Y., Wei Y.M., Zheng Y.L., Ouellet T. // Fungal Biol. 2012. V. 116. № 3. P. 413–426.
165. Qi P.F., Zhang Y.Z., Liu C.H., Zhu J., Chen Q., Guo Z.R., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 8. Article 2351. <https://doi.org/10.3390/ijms19082351>
166. Hao G., Naumann T.A., Vaughan M.M., McCormick S., Usgaard T., Kelly A., Ward T.J. // Front. Microbiol. 2019. V. 9. Article 3219. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03219>
167. Chen K., Li G.J., Bressan R.A., Song C.P., Zhu J.K., Zhao Y. // J. Integr. Plant Biol. 2020. V. 62. № 1. P. 25–54.
168. Nambara E., Marion-Poll A. // Annu. Rev. Plant Biol. 2005. V. 56. P. 165–185.
169. Weng J.K., Ye M., Li B., Noel J.P. // Cell. 2016. V. 166. № 4. P. 881–893.
170. Kettner J., Dörffling K. // Physiol. Plant. 1987. V. 69. № 2. P. 278–282.
171. Syrova D.S., Shaposhnikov A.I., Makarova N.M., Gagkaeva T.Y., Khrapalova I.A., Emelyanov V.V., Gogolev Y.V., Gannibal P.B., Belimov, A.A. // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 5. P. 301–310.
172. Cohen A.C., Bottini R., Piccoli P.N. // Plant Growth Regul. 2007. V. 54. № 2. P. 97–103.
173. Milborrow B.V. // Abscisic acid. /Ed. F.T. Addicott. N.Y.: Praeger Scientific, 1983. P. 79–111.
174. Hartung W., Sauter A., Turner N.C., Fillery I., Heilmeyer H. // Plant Soil. 1996. V. 184. № 1. P. 105–110.
175. Hasegawa S., Poling S.M., Maier V.P., Bennett R.D. // Phytochemistry. 1984. V. 23. № 12. P. 2769–2771.
176. Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Dumova V.A., Shaposhnikov A.I., Ladatko A.G., Davies W.J. // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 74. P. 84–91.
177. Yuzikhin O.S., Gogoleva N.E., Shaposhnikov A.I., Konnova T.A., Osipova E.V., Syrova D.S., et al. // Biomolecules. 2021. V. 11. № 3. Article 345. <https://doi.org/10.3390/biom11030345>
178. Lu Q., Weng Y., You Y., Xu Q., Li H., Li Y., Liu H., Du S. // Environ. Pollut. 2020. V. 257. Article 113497. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113497>
179. Norman S.M., Maier V.P., Echols L.C. // Appl. Environ. Microbiol. V. 41. № 4. P. 981–985.
180. Marumo S., Katayama M., Komori E., Ozaki Y., Natsume M., Kondo S. // Agric. Biol. Chem. 1982. V. 46. № 7. P. 1967–1968.
181. Zhang H., Xie X., Kim M.S., Korniyev D.A., Holaday S., Paré P.W. // Plant J. 2008. V. 56. № 2. P. 264–273.
182. Porcel R., Zamarreño Á.M., García-Mina J.M., Aroca R. // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. № 1. P. 1–12.
183. Kang S.M., Khan A.L., Waqas M., You Y.H., Kim J.H., Kim J.G., Hamayun M., Lee I.J. // J. Plant Interact. 2014. V. 9. № 1. P. 673–682.
184. Kang S.M., Khan A.L., Hamayun M., Hussain J., Joo G.J., You Y.H., Kim J.K., Lee I.J. // J. Microbiol. 2012. V. 50. № 6. P. 902–909.
185. Kandawangko N.Y., Suryatmana G., Nurlaeny N., Si-manungkalit R.D.M. // Hayati J. Biosciences. 2009. V. 16. № 1. P. 15–20.
186. Ouledali S., Ennajeh M., Ferrandino A., Khemira H., Schubert A., Secchi F. // S. Afr. J. Bot. 2019. V. 121. P. 152–158.
187. Khan A.L., Hamayun M., Khan S.A., Kang S.M., Shinwari Z.K., Kamran M., Rehman S., Lee I.J. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. № 4. P. 1483–1494.
188. Jiang F., Chen L., Belimov A.A., Shaposhnikov A.I., Gong F., Meng X., Hartung W., Jeschke D.W., Davies W.J., Dodd I.C. // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 18. P. 6421–6430.
189. Wasternack C., Song S. // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. № 6. P. 1303–1321.
190. Eng F., Marin J.E., Zienkiewicz K., Gutiérrez-Rojas M., Favela-Torres E., Feussner I. // PeerJ. 2021. V. 9. e10873. <https://doi.org/10.7717/peerj.10873>
191. Dart R.K., Kerry S., Marples B.A. // Enzyme Microb. Technol. 1992. V. 14. № 12. P. 954–958.
192. Miersch O., Porzel A., Wasternack C. // Phytochemistry. 1999. V. 50. № 7. P. 1147–1152.
193. Miersch O., Schneider G., Sembdner G. // Phytochemistry. 1991. V. 30. № 12. P. 4049–4051.
194. Miersch O., Regvar M., Wasternack C. // Phyton (Horn). 1999. V. 39. № 3. P. 243–248.
195. Coleman N.V., Mattes T.E., Gossett J.M., Spain J.C. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 12. P. 6162–6171.
196. Danko A.S., Saski C.A., Tomkins J.P., Freedman D.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 5. P. 3756–3758.
197. Elsgaard L., Andersen L. // Plant and Soil. 1998. V. 202. № 2. P. 231–239.
198. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Кошелева И.А., Боронин А.М. // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 703–711.
199. Buswell J.A., Paterson A., Salkinoja-Salonen M.S. // FEMS Microbiol. Lett. 1980. V. 8. P. 135–137.
200. Feng T.C., Cui C.Z., Dong F., Feng Y.Y., Liu Y.D., Yang X.M. // J. Appl. Microbiol. 2012. V. 113. № 4. P. 779–789.
201. Патент РФ. 2006. № RU2352629C2.
202. Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Кошелева И.А., Соколов С.Л., Сечеников А.А., Туток М.А., Боронин А.М. // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2014. № 1. С. 300–311.
203. Cámara B., Strömpl C., Verburg S., Spröer C., Pieper D.H., Tindall B.J. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. № 5. P. 923–931.
204. Engelhardt G., Rast H.G., Wallnöfer P.R. // FEMS Microbiol. Lett. 1979. V. 5. P. 245–251.
205. Grund E., Denecke B., Eichenlaub R. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 6. P. 1874–1877.
206. Elufisan T. O., Rodriguez-Luna I. C., Oyedara O. O., Sanchez-Varela A., García V. B., Oluyide B. O., Flores-Treviño S., López M., Guo, X. // Afr. Health Sci. 2020. V. 20. № 1. P. 168–181.
207. Haribabu B., Kamath Ajith V., Vaidyanathan C.S. // J. Indian Inst. Sci. 1984. V. 65. № 9. P. 69–69.

Destruction and Transformation of Phytohormones by Microorganisms

D. S. Syrova^a, A. I. Shaposhnikov^a, O. S. Yuzikhin^{a, b}, and A.A. Belimov^{a, *}

^a *All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, 196608 Russia*

^b *All-Russian Institute of Plant Protection, (FSBSI VIZR), St. Petersburg–Pushkin, 196608 Russia*

**e-mail: belimov@rambler.ru*

Phytohormones is a group of structurally diverse low-molecular organic substances that regulate all processes of plant life. It is well known that many microorganisms interacting with plants possess the ability to synthesize phytohormones. However, beneficial and pathogenic microorganisms can destroy, transform, utilize as nutrients and affect concentrations of phytohormones in plants. This review discusses the distribution of these properties in soil and plant-associated bacteria and fungi, as well as the biochemical pathways of microbial destruction and transformation of the main classes of phytohormones. An analysis of information on the interaction of microorganisms with plants caused by a modulation in the phytohormone content and the role of these phenomena in the formation of symbiotic plant-microbial systems is presented.

Keywords: auxins, biocontrol, gibberellins, jasmonates, microbial-plant interactions, catabolism, salicylic acid, symbiosis, phytohormones, phytopathogens, cytokinins, ethylene

УДК 579.62

ЭЛЕКТРОМЕТАНОГЕНЕЗ – ПЕРСПЕКТИВНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ (ОБЗОР)

© 2022 г. Ю. В. Литти¹, *, Ю. И. Русскова¹, Е. А. Журавлёва¹, С. Н. Паршина¹, А. А. Ковалёв², Д. А. Ковалёв², А. Н. Ножевникова¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, 109428 Россия

*e-mail: litty-yuriy@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2021 г.

После доработки 12.07.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Способность микроорганизмов в анаэробных условиях осуществлять межвидовой перенос электронов в процессе деградации органических веществ открывает новые возможности управляемого повышения эффективности метаногенного разложения органических отходов. В обзоре представлены основные принципы воздействия постоянного электрического тока на анаэробную деградацию органических веществ, параметры процесса, изменение состава микробного сообщества и факторы, влияющие на оптимизацию работы гибридных систем МЭЯ-АР (микробная электролизная ячейка (МЭЯ)-анаэробный реактор (АР)). Проведен анализ исследований в данной области для последующего применения электрометаногенеза – новой энергоэффективной технологии анаэробной очистки сточных вод и переработки органических отходов.

Ключевые слова: анаэробное сбраживание, микробная электролизная ячейка, анаэробный реактор, система МЭЯ-АР, электроактивные микроорганизмы, электрометаногенез

DOI: 10.31857/S0555109922010056

Более ста лет назад английский ботаник Поттер (М.С. Potter) показал, что бактерии и дрожжи при разложении органических веществ могут образовывать небольшое количество электричества. Однако это открытие не привлекло должного внимания, и последующие исследования по использованию микроорганизмов в качестве источников энергии не воспринимались всерьез при рассмотрении их возможного практического применения [1, 2]. В дальнейшем отдельные группы исследователей изучали биоэлектрохимические системы (БЭС) – устройства, в которых используются микроорганизмы для катализа реакций окисления или восстановления на электродах с целью разложения органических веществ. Повышенный интерес к БЭС возродился только к началу XXI в. благодаря осознанию обществом последствий экологических проблем, включая необходимость переработки органической составляющей коммунальных отходов и, соответственно, разработки технологий для устойчивого управления окружающей средой и ресурсами нашей планеты. В настоящее время активно развивается концепция применения БЭС для очистки сточных вод с одновременным получением энергии и полезных веществ [2–4].

Открытие восстановления ионов металлов микроорганизмами и внеклеточного переноса электронов (ВПЭ, EET – Extracellular Electron Transfer) положило начало развитию современной электромикробиологии, изучающей электрокаталитическую активность электроактивных микроорганизмов: экзоэлектрогенов (электрогенов, электронодоноров) и электротрофов (электроноакцепторов). Первые могут осуществлять перенос электронов на аноды различных типов БЭС и производить электрический ток. Эксперименты с чистыми культурами показали, что многие микроорганизмы: бактерии, дрожжи и археи – являются экзоэлектрогенами. Электротрофы получают электроны с катода и используют разнообразные концевые акцепторы электронов для клеточного дыхания, включая диоксид углерода, с образованием метана [5, 3]. Многие генерирующие энергию биосистемы (бактерии, археи, митохондрии и хлоропласты) осуществляют перенос электронов через электрические “проводники” – мембранные системы с растворимыми донорами и акцепторами электронов. В то же время микроорганизмы, способные к ВПЭ, обладают молекулярными механизмами, обеспечивающими поток электронов с нерастворимыми

донорами и акцепторами электронов. Способность микроорганизмов к ВПЭ и взаимодействие между электроактивными микроорганизмами в синтрофных ассоциациях в природе определяют устойчивость природных систем на Земле [1].

В настоящее время выделяют два типа межвидового переноса электронов (МПЭ, IET – Interspecies Electron Transfer): опосредованный (ОМПЭ, IIET – Indirect Interspecies Electron Transfer) и прямой (ПМПЭ, DIET – Direct Interspecies Electron Transfer), которые лежат в основе синтрофных взаимодействий микроорганизмов в процессе анаэробной дегградации органических веществ. Микроорганизмы, участвующие в ПМПЭ, связаны друг с другом через клеточные компоненты, такие как мембранно-ассоциированные цитохромы или проводящие пили, которые позволяют проводить обмен электронов без окислительно-восстановительных медиаторов, характерных для процесса ОМПЭ. Имеются доказательства осуществления процесса ПМПЭ между экзоэлектрогенными и электротрофными микроорганизмами в экспериментальных синтрофных культурах, кокультурах и в анаэробных реакторах (АР, AD – Anaerobic Digester) [5–8]. Исследования показали, что большое количество электронодонорных бактерий и электротрофных метаногенов могут создавать основанные на ПМПЭ синтрофные консорциумы в зависимости от условий в АР: тип субстрата, концентрация и скорость подачи органических веществ, конфигурация АР и др. [6]. Электропроводящие материалы могут выступать в качестве замены биологических проводящих структур и стимулировать ПМПЭ между микроорганизмами в АР [9, 6]. В последние годы в мире произошел всплеск исследований, посвященных роли ПМПЭ в процессе анаэробной дегградации органических веществ. Внесение различных форм электропроводящих материалов: магнетита, графита, пироугля, гранулированного активированного угля (ГАУ) и углеродной ткани – стимулирует ПМПЭ и тем самым повышает производительность АР [7, 10–12]. На русском языке вышел первый обзор о механизмах процесса ПМПЭ и исследованиях о применении электропроводящих материалов в АР с целью ускорения ПМПЭ для анаэробного разложения органических веществ синтрофными сообществами микроорганизмов [13]. В настоящем обзоре, который является продолжением вышеуказанного первого обзора, приводятся сведения о стимуляции реакций ПМПЭ путем приложения внешнего напряжения к электродам, размещенным в АР, и ускорении процесса электрометаногенеза [14–16].

Интеграция микробной электролизной ячейки (МЭЯ, MEC-Microbial Electrolysis Cell) с метантенком, обычным АР (МЭЯ-АР), ускоряет процессы ПМПЭ и производства биометана [14, 15, 17–19]. Совмещение МЭЯ и АР в исследованиях и

на практике возможно в двух конфигурациях: электроды встраиваются внутри АР, или АР располагается отдельно и гидравлически связан с внешним МЭЯ [20]. Такое совмещение помогает компенсировать недостатки МЭЯ и АР и, взаимно дополняя друг друга, позволяет улучшить конверсию отходов и производство энергии [21]. Следует отметить, что система МЭЯ-АР показала свою эффективность не только на примере синтетических сточных вод, но и для получения биометана из высококонцентрированных сточных вод, образующихся в различных отраслях промышленности. МЭЯ могут использоваться для последующего процесса доочистки стоков, но не заменяют обычные АР [20].

Электрометаногенез в системе МЭЯ-АР является одним из направлений современного биоэлектросинтеза и новым подходом к переработке отходов и получению возобновляемой энергии в химически стабильном соединении – метане. Такая технология является экологичной, поскольку осуществляется с фиксацией диоксида углерода.

Микробные электрохимические технологии. При биологическом разложении органических веществ в БЭС происходит электрохимическое окисление на аноде и восстановление на катоде. Биоэлектрохимические процессы обеспечивают поток электронов и стимулируют рост определенных микроорганизмов при решении конкретной технологической задачи. Например, процесс получения биоводорода называется “электрогидрогенез”. Таким образом, электрохимия распространяется и на область биоэлектрохимии [2].

БЭС подразделяются на: (1) микробные топливные элементы (МТЭ), преобразующие энергию химических связей органических веществ в электричество с помощью микроорганизмов; (2) микробные электролизные ячейки (МЭЯ), где с приложением электрического напряжения происходит производство продуктов с добавленной стоимостью [22, 23].

Термин “МЭЯ” был предложен для замены ранее применяемых определений “биокатализируемая электролизная камера” (БЭК, BEC – Bio-Electrochemical Cell) или “биоэлектрохимический микробный реактор” (БЭМР, BEAMR – Bioelectrochemically Assisted Microbial Reactor) при разработке первых биоэлектрохимических процессов, когда в анаэробных условиях микроорганизмы образовывали газообразный водород за счет электролиза органических веществ в противоположность электролизу воды в МТЭ [22, 24, 25]. Выработка электроэнергии в МТЭ происходит с окислением органического вещества, например, ацетата, экзоэлектрогенными бактериями на аноде ($E_{An} = -0.2$ В относительно стандартного водородного электрода, СВЭ) и восстановлением кислорода на катоде ($E_{Cat} = 0.2$ В), с потенциа-

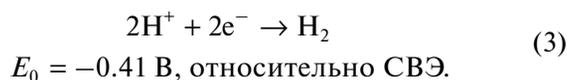
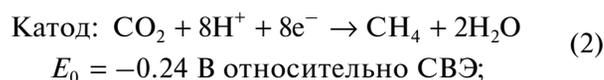
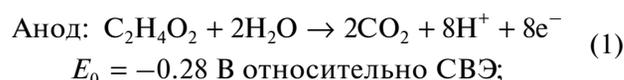
лом рабочей ячейки приблизительно 0.4 В и теоретическим потенциалом до 1.1 В при нейтральном рН 7.0. В МЭЯ на аноде также происходит окисление органических веществ с высвобождением электронов и протонов, а затем электроны переносятся на катод, где объединяются с протонами, образуя газообразный водород (H_2). В отличие от МТЭ, в МЭЯ суммарные реакции на электродах осуществляются с положительной энергией Гиббса (ΔG) и, таким образом, для функционирования системы требуется подача энергии [9, 22, 26]. В однокамерной МЭЯ, работающей при атмосферном давлении при рН 7.0 равновесное напряжение в ячейке составляет 0.123 В, и при использовании ацетата в качестве субстрата становится возможным получение газообразного водорода при всего 1/10 равновесного напряжения 1.23 В для электролиза воды [27]. Однако, учитывая перенапряжение и внутреннее сопротивление, необходима подача небольшого напряжения (обычно в диапазоне от 0.2 до 1.0 В) для выделения водорода на катоде. Потребность в энергии для МЭЯ составляет всего около 0.6 кВт ч m^{-3} , тогда как при электролизе воды требуется 4.5–5.0 кВт ч m^{-3} [22].

Из-за слабых токов, получаемых в МТЭ, в настоящее время исследователи чаще выбирают своим объектом изучения МЭЯ, в которых за счет приложения небольшой дополнительной внешней энергии происходит разложение органических веществ отходов с образованием ценных продуктов (например, метана), и эти системы являются перспективными для практического применения.

Электрометаногенез. Впервые, согласно литературным данным, метан был получен в электрохимическом устройстве – аналоге МЭЯ в 1999 г., когда в процессе на катоде с приложенным потенциалом -1.5 В электрически восстановленный диазолиновый краситель нейтральный красный служил в качестве единственного донора электронов вместо H_2 для восстановления CO_2 и получения метана [28]. Термин “электрометаногенез” в значении образования метана на биокатоде МЭЯ был предложен для процесса получения метана из CO_2 в качестве единственного источника углерода с использованием биокатода. При оценке влияния различных потенциалов катода (от -0.6 до -1.2 В относительно $Ag/AgCl$) на получение метана из CO_2 в однокамерном МЭЯ образование метана было отмечено только тогда, когда потенциал катода смещался в более отрицательную область -0.7 В относительно $Ag/AgCl$ (-0.5 В относительно СВЭ), при этом на биокатоде доминировал единственный представитель архей *Methanobacterium palustre* [29]. Эти отрицательные величины катодного потенциала значительно отличались от теоретического окислительно-восстановительного потенциала превра-

щения CO_2 в CH_4 (-0.24 В относительно СВЭ) или CO_2 в ацетат (-0.29 В относительно СВЭ). Наблюдаемые различия в катодных окислительно-восстановительных потенциалах можно отнести к перенапряжениям (катодной поляризации) [22].

Как и при электрогенезе, в МЭЯ анодные экзоэлектрогенные бактерии окисляют простые органические кислоты и переносят электроны в среду посредством ВПЭ. Катодный электрометаногенез включает образование метана через (1) прямое потребление электронов от электрода (прямой электрометаногенез на основе ПМПЭ) и (2) опосредованное водородом или другими соединениями, такими как формиат, ацетат или другие медиаторы (опосредованный электрометаногенез по принципу ОМПЭ) [14, 30]. Ряд уравнений описывает биоэлектрохимические процессы на аноде (1) и катоде (2 и 3) МЭЯ в процессе электрометаногенеза (рис. 1) [16, 22].



Таким образом, теоретически электрометаногенез может происходить с более низким потреблением энергии, чем то, которое требуется для абиотического образования H_2 . Поддержание катодного потенциала более положительным, чем -0.41 В относительно СВЭ, может способствовать осуществлению метаногенеза посредством ПМПЭ путем ограничения образования H_2 . Однако на практике требуется более отрицательный катодный потенциал (от -0.5 В), чтобы компенсировать высокое перенапряжение электродов и внутреннее сопротивление в системе, что в конечном итоге увеличивает потребление энергии для осуществления процесса электрометаногенеза [31].

Одна из первых систем МЭЯ-АР представляла собой совмещение МЭЯ в однокамерном АР из нержавеющей стали, который сам служил катодом МЭЯ посредством подключения небольшого напряжения (1.0 В). При функционировании МЭЯ-АР содержание CH_4 в биогазе увеличивалось до 98% и скорость удаления органических веществ, выраженных в ХПК (химическое потребление кислорода), повышалась втрое, при этом выход CH_4 увеличился в 2.3 раза, а потребление углерода повысилось на 56.2%. Углекислота (CO_2) превращалась *in situ* в CH_4 , на аноде доминирующими гидрогенотрофными метаногенами были представители *Methanospirillum*, потреблявшие газообразный водород, генерируемый на

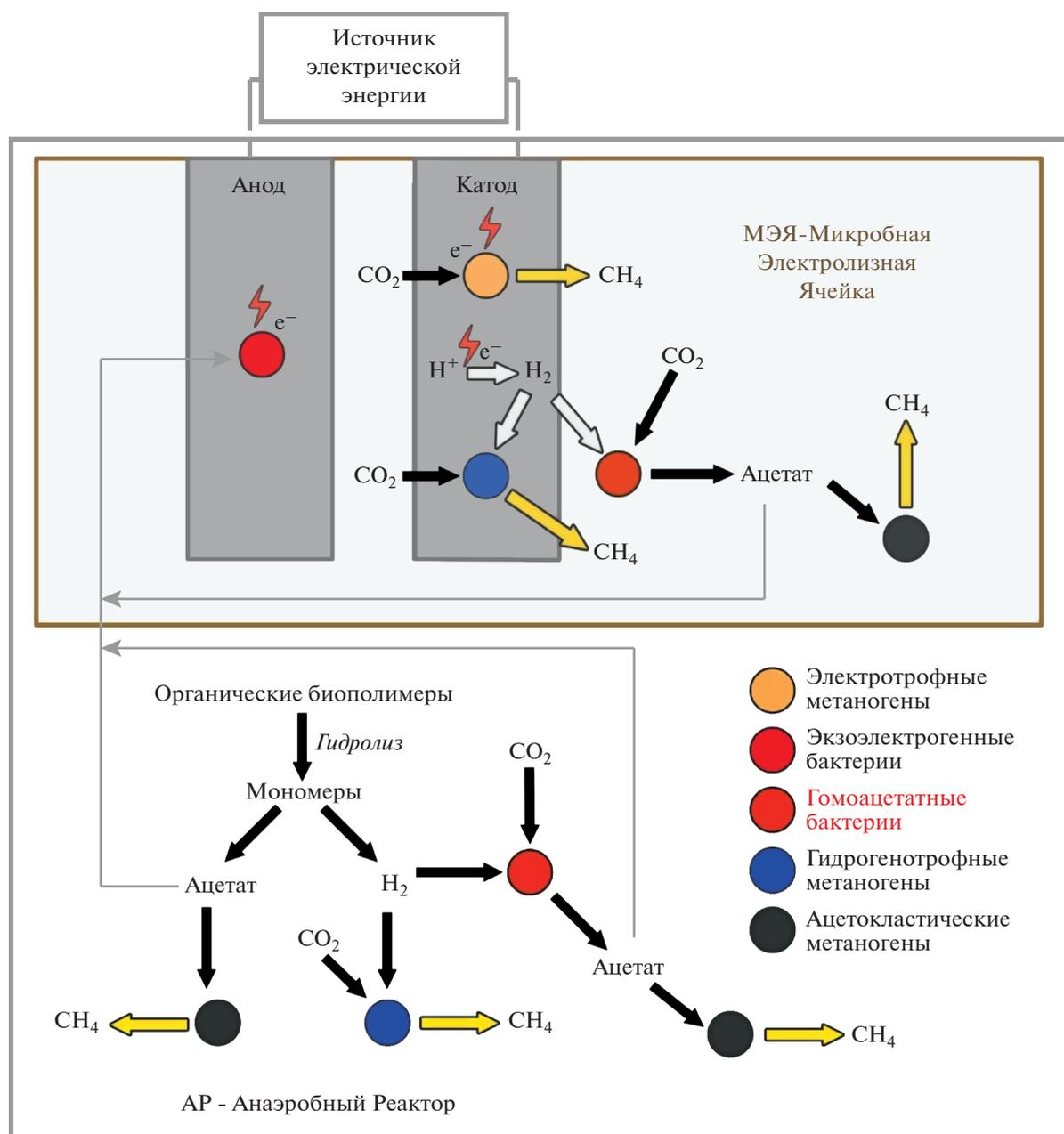


Рис. 1. Концептуальная схема различных путей метаногенеза в системе МЭЯ-АР [19, 34].

внутренней поверхности АР (катода МЭЯ). Общая энергоэффективность МЭЯ-АР составила 66.7% [32].

МЭЯ – многообещающая технология для улучшения производства биогаза при анаэробной переработке органических отходов. Биоэлектрохимическое производство метана из возобновляемых источников в настоящее время считается основным перспективным применением электрометаногенеза [14]. В табл. 1 приведены технологические параметры МЭЯ-АР, перерабатывающих различные органические отходы. Эффективность процесса продемонстрирована на

основании показателей снижения ХПК и увеличения выхода метана. В сравнении с АР в МЭЯ-АР процесс анаэробного метаногенного разложения органических веществ ускоряется за счет стимулирования электрометаногенеза наряду с обычными путями метаногенеза [16]. Оптимизация конструкций метанпроизводящих МЭЯ может способствовать коммерциализации технологии, при этом МЭЯ являются не конкурентной, но дополняющей технологией для АР. Электрометаногенез имеет неоспоримые преимущества перед электрогенезом, так как нет строгих требований к хранению метана в отличие

Таблица 1. Технологические параметры и характеристики процесса метанообразования в системах МЭЯ-АР [19, 20]

Субстрат	ХПК субстрата, г/л	Тип реактора, (объем)	Электрическое напряжение, В	Температура, °С	Удаление ХПК, %	Увеличение выхода метана (раз)
Избыточный активный ил	15.65	1-камерный МЭЯ-АР (0.7 л)	0.8	20	41.2	1.56
Избыточный активный ил	11.75	1-камерный МЭЯ-АР (0.3 л)	1.4–1.8	37	–	11.4–13.6
Избыточный активный ил	16.98	1-камерный МЭЯ-АР (0.3 л)	0.6–2.3	37	39.65–96.65	1.2–1.79 (0.6–1.8 В); 0.34 (2.3 В)
Избыточный активный ил	114.2	1-камерный МЭЯ-АР (2.0 л)	0.3–0.6	35	–	1.63 (0.3 В) 0.65 (0.6 В)
Избыточный активный ил	36.69	1-камерный МЭЯ-АР (0.6 л)	0.6	35	36.7	1.30
Осадки сточных вод	10	1-камерный МЭЯ-АР (1.2 л)	0.3–0.6	35	–	1.81–1.85
Ферментированный жидкий ил	17.51	1-камерный МЭЯ-АР (0.65 л)	0.8	20–25	–	1.64
Осадки сточных вод	74	2-камерный МЭЯ-АР (2.4 л + 0.18 л)	$E_{\text{раб}} = -0.8$	55	50–78	1.3–3.57
Избыточный активный ил	–	1-камерный МЭЯ-АР (1 л)	0.3–1.5	35	–	1.2–1.76 (0.3; 0.6; 1.2; 1.5 В) 0.52 (0.9 В)
Синтетическая среда	10.7	1-камерный МЭЯ-АР (0.18 л)	0.4–1.0	30	100	1.9–2.3
Пищевые отходы	60.3	1-камерный МЭЯ-АР (25 л)	0.3	35	76.1	1.03–1.68
Личаты пищевых отходов	63	1-камерный МЭЯ-АР (25 л)	0.3	35	80.7	2.55
Бытовые сточные воды	15.5	2-камерный МЭЯ-АР (20 л + 4.2 л)	2.0	30	85	5
Промывная вода мусоросжигания	4.8–21.0	1-камерный МЭЯ-АР (0.5 л)	0.7	35	32–94	1.25–1.57
Метанольные сточные воды	13.3	1-камерный МЭЯ-АР* (0.5 л)	0.4–0.6	35	98.9	1.10–1.29
Сточные воды процесса Фишер-Тропш	28.9–31.2	1-камерный МЭЯ-АР (4.8 л)	1.5	34	86.8	1.31
Избыточный активный ил	7.89	1-камерный МЭЯ-АР (0.18 л)	0.5–1	22.5	83	–
Избыточный активный ил/глюкоза	1	1-камерный МЭЯ-АР (0.5 л)	0.6	37	17	1.1
Глюкоза	1–7	1-камерный МЭЯ-АР* (1.0 л)	1	35	–	3–4.8
Глюкоза	3	1-камерный МЭЯ-АР (0.75 л)	0.3	35	–	1.7

* В качестве АР использован реактор типа АИВП.

от водорода, не требуется дорогостоящая платина для материала катода, как для получения водорода биоэлектрохимическим путем, и нет необходимости прилагать усилия по подавлению метаногенеза в системе, как при получении водорода [22, 33]. Последние исследования показали, что применение МЭЯ-АР может ускорить деградацию субстрата, включая трудноразлагаемые соединения, и обеспечить стабильность процесса по сравнению с традиционными АР. Важным показателем эффективности МЭЯ-АР относительно АР является изменение микробного сообщества АР вследствие активного роста электроактивных микроорганизмов с образованием метана преимущественно по гидрогенотрофному пути, что приводит к увеличению производства биогаза с повышенным содержанием метана [18, 19, 34, 35].

Микробное сообщество МЭЯ-АР. Исследование процессов, происходящих в микробных (бактерии и археи) сообществах при приложении разницы потенциалов к системе имеют важное значение для контроля и управления процессом. В настоящее время активно изучается микробный состав биопленок электродов и свободноплавающей биомассы, состоящей из планктонных или агрегированных микроорганизмов в жидкой среде между поляризованными биоэлектродами в МЭЯ-АР. Электрохимическое воздействие стимулирует микробный метаболизм и скорость роста микроорганизмов, а также влияет на изменение состава сообщества бактерий/архей в смешанных консорциумах микроорганизмов [36, 37].

ПМПЭ между экзоэлектрогенными окислителями летучих жирных кислот (ЛЖК) и электроотрофными метаногенами играет важную роль в поддержании сбалансированного общего процесса анаэробного разложения. К настоящему времени можно определенно утверждать, что электропроводящие материалы и поданное в АР внешнее электрическое напряжение стимулируют процессы метаболизма органических веществ и выход биогаза по механизму ПМПЭ [11, 12, 15].

Процесс электрометаногенеза осуществляют комплексные синтрофные сообщества микроорганизмов МЭЯ-АР, входящие в состав биопленок электродов и планктонной биомассы и состоящие из экзоэлектрогенных бактерий, гидролитиков, броуидильщиков и электротрофных метаногенов [19, 38, 39]. Взаимодействие между электроактивными/кислотогенными/гидролитическими бактериями и метаногенными археями в МЭЯ-АР описывается термином “электросинтрофия” как и для процессов взаимодействия микроорганизмов в присутствии электропроводящих материалов [14]. Различные микроорганизмы развиваются на аноде, катоде или в жидкой среде, поэтому важно охарактеризовать как прикрепленное, так и планктонное сообщество, чтобы понять функцио-

нальные роли микроорганизмов, а также их взаимодействие в процессе электрометаногенеза. Знание того, как производительность МЭЯ-АР соотносится с изменениями в популяциях бактерий и архей при электрическом воздействии, какие консорциумы микроорганизмов и их метаболические свойства будут влиять на производительность системы – помогут оптимизировать энергоэффективность МЭЯ-АР [14, 40].

Состав микробного сообщества биопленок анода и катода МЭЯ, а также взвешенной биомассы в АР изменяется при приложении напряжения к системе МЭЯ-АР [19, 20, 37]. В табл. 2 обобщены сведения о доминирующих представителях микробного сообщества биопленок электродов и взвешенной биомассы в МЭЯ-АР, перерабатывающих различные органические субстраты: ацетат, другие ЛЖК, глюкозу, этанол, фенол, пищевые отходы, анаэробный ил. Сопоставление применяемых субстратов в МЭЯ-АР и обычном АР выявляет общую закономерность: чем сложнее субстрат, тем более разнообразные микроорганизмы представлены в биопленках электродов и планктонной биомассе [15]. В бактериальных сообществах анода и взвешенной биомассы доминируют экзоэлектрогенные бактерии, гидролитики и броуидильщики. Состав сообществ микроорганизмов, растущих в электроактивных биопленках на электродах, отличается от структуры исходного инокулята. Заметные различия в составе сообществ можно было наблюдать при сравнении анодов и катодов. Также на увеличение разнообразия микробных популяций в МЭЯ значительное влияние оказывают применяемые материалы электродов [40].

ВПЭ возникает как на аноде (электрод/металл восстанавливается), так и на катоде (электрод/металл окисляется). Электроактивность наблюдается у грамположительных и грамотрицательных бактерий, архей, микроскопических грибов, как иммобилизованных в электрогенные биопленки, так и у планктонных микроорганизмов [3, 8]. Микроорганизмы переносят электроны на анод различными способами: путем прямого контакта цитохромов внешней мембраны с поверхностью клетки; через флавины, которые способны передавать электроны между клеткой и анодом; через проводящие пилы (нанопровода), которые могут обеспечить перенос электронов на большие расстояния [3, 7]. Некоторые экзоэлектрогенные бактерии могут играть двойную роль и осуществлять процессы, как брожения, так и ВПЭ к электродам. Однако большинство электронодоноров находятся в синтрофных ассоциациях с гидролитиками, броуидильщиками, гомоацетогенами, способность которых к ВПЭ окончательно не доказана [6]. В системах МЭЯ-АР анодные экзоэлектрогенные бактерии имеют преимущество перед медленно растущими ацетокластическими метаногенами при использовании ацетата в качестве субстрата, а образующиеся

Таблица 2. Состав микробного сообщества в однокамерных МЭЯ-АР [16, 19, 37]

Инокулят	Субстрат	Анод		Катод		Суспензия	
		археи	бактерии	археи	бактерии	археи	бактерии
Избыточный активный ил	Ацетат	–		Гидрогенотрофные метаногены			
Ил АР	Меласса	<i>Methanosaeta</i>	<i>Peritoniophilus</i>	<i>Methanosaeta</i>		<i>Methanosaeta</i>	<i>Peritoniophilus</i>
Ил реактора UASB	Осадки сточных вод (ОСВ)	–	<i>Methylovirgulaligni</i>	<i>Methanosarcina</i>			
Ил реактора UASB	Глюкоза	–	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Methanobacterium</i>		<i>Methanobacterium</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Избыточный активный ил	Избыточный активный ил	–	<i>Levilinea</i>			<i>Methanosaeta</i>	<i>Syntrophomonas</i>
Избыточный активный ил	Ацетат	–	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Acetobacterium</i>		
Избыточный активный ил	Глюкоза	–				<i>Methanosaeta</i>	
Ил АР	Ацетат и смесь ЛЖК	–				<i>Methanosarcina</i>	<i>Geobacter</i>
Ил АР	Избыточный активный ил	–				<i>Methanomicrobiales</i>	
Ил АР	Пищевые отходы	–				<i>Methanosarcina</i>	<i>Clostridia</i>
Ил АР	ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират)	–	<i>Geobacter</i>			<i>Methanobacterium</i>	
Биоэлектрохимический активный ил	ОСВ	–					<i>Cloacimonas</i>
Ил АР	Первичный ОСВ	–				Гидрогенотрофные метаногены	<i>Pseudomonas</i>
Ил АР	Ацетат	–	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Geobacter, Pseudomonas</i>
Осадок пресноводного болота	Ацетат	–	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Geobacter</i>
Избыточный активный ил	Ацетат	<i>Methanosarcina</i>	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Geobacter</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>Geobacter</i>

электроны через катодное электрохимическое восстановление протонов переносятся на H_2 [16]. Наиболее изученными и часто встречающимися экзоэлектрогенами являются представители филума *Proteobacteria* класса *Geobacteriaceae* рода *Geobacter*, которые доминировали в анодных биопленках, а также присутствовали в суспензии и в биопленках катода [37, 40, 41]. Виды *Geobacter* способны непосредственно передавать электроны электротрофным бактериям и метаногенам через ПМПЭ [7]. На аноде, как правило, доминируют представители филума *Firmicutes* (классы *Clostridia* и *Negativicutes*) и представлены филумы *Bacteroidetes* (класс *Bacteroidia*), которые составляют более 70% бактерий на аноде. Кроме того, экзоэлектрогенная бактерия *Syntrophaceticus schinkii* класс *Clostridia* была типичным обитателем анода [42]. В анодных биопленках количество представителей филума *Proteobacteria* (классы *Geobacteriaceae* и *Rhodocyclaceae*) увеличивалось до 52.44% с приложенным напряжением 0.8 В и снижалось до 18.82% после снятия напряжения [37]. Приложенные напряжения 1.0 В ускоряло рост бактерий родов *Ruminococcus* и *Veillonellaceae* и уменьшало рост бактерий родов *Clostridium* и *Thermoanaerobacterium*, что приводило к накоплению пропионата и этанола и снижению концентрации бутирата. При этом в системе наблюдали накопление ацетата, что не нашло однозначного объяснения [43]. В катодных биопленках в большинстве исследований преимущественно доминировали гидрогенотрофные метаногены (*Methanobacterium*, *Methanospirillum* и др.), что можно объяснить образованием на катоде H_2 (уравнение 3), устойчивостью этих архей по сравнению с ацетокластическими метаногенами к колебаниям рН и к ингибированию аммиаком, выделяемым при разложении богатых белком отходов [19, 44]. При характеристике биопленок на поверхности катода выделяли внутренние и внешние слои, при этом между этими слоями не было обнаружено существенных различий. В контрольном АР преобладали метаногенные археи рода *Methanobrevibacter* и *Methanosarcina*, а на катоде МЭЯ-АР при приложенном напряжении 0.8 В – *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* и представители рода *Methanobacteriaceae* [45].

Метаногенные археи ответственны за заключительную стадию анаэробного разложения – производство метана. Метан, основной продукт метаногенеза, образуется: (1) автотрофно из водорода и CO_2 гидрогенотрофными метаногенами, из всех известных семейств: *Methanoculleus* и *Methanolineales*, *Methanosarcinales* и др., за исключением *Methanomassiliicoccales*; (2) метилотрофно из С1 соединений – метанола, формиата, метиламинов: *Methanosarcinales* и другие метилотрофные метаногены *Methanomassiliicoccales*, *Methanobacteriales*; (3) путем разложения ацетата ацетокластическими метаногенами порядка *Methanosarcinales* [46], пред-

ставители которого содержат цитохром и могут использовать не только ацетат, но и метанол, метиламины и H_2/CO_2 в качестве субстратов [37]. Образование метана в классических АР происходит главным образом из ацетата (70% – ацетокластический путь), и в меньшем количестве из газообразного водорода – гидрогенотрофный путь [47]. Напротив, в МЭЯ-АР преобладает гидрогенотрофный путь метаногенеза, поскольку гидрогенотрофные метаногены могут использовать образующийся на катоде водород для преобразования CO_2 в CH_4 [29, 48].

Ацетат также может быть превращен в метан при участии синтрофных ацетатоокисляющих бактерий (САОБ, SAOB – syntrophic acetate-oxidizing bacteria), для которых данная реакция сама по себе термодинамически невозможна, и она происходит при условии немедленного потребления гидрогенотрофными метаногенами в качестве донора электронов водорода, который образуется при окислении ацетата. Однако независимо от типа метаногенных реакций все пути в конечном итоге приводят к процессу, в котором кофермент М (CoM) превращает метильную группу в метил CoM (Me-CoM) для получения CH_4 . Таким образом, CoM играет решающую роль в общем процессе метаногенеза, а, следовательно, его можно использовать в качестве маркера контроля получения метана [34]. При анализе образцов биомассы на катоде было количественно определено больше копий архейного гена *mcrA*, кодирующего фермент для катализа терминальной стадии метаногенеза метил-коэнзим М редуктазу (methyl-coenzyme M reductase – MCR), чем в планктонной биомассе, что подтвердило ускорение роста гидрогенотрофных метаногенов на катоде и, возможно, преимущественное образование метана по гидрогенотрофному пути в системе МЭЯ-АР при 0.8 В с ацетатом (1.5 г/л) в качестве субстрата. Соответственно, была отмечена положительная корреляция между образованием CH_4 и обилием копий генов *mcrA* в биопленках [37].

Одна из стратегий быстрого запуска МЭЯ-АР заключается в предварительном подборе подходящего микробного сообщества и использования его в качестве инокулята [49]. Суспензия микроорганизмов из МТЭ, соскоб биопленки анода, болотный ил и ил из других источников, содержащих экзоэлектрогенные бактерии, обычно применяются в качестве инокулята в МЭЯ для очистки сточных вод (табл. 2) [50]. Обогащенные определенными электроактивными микроорганизмами сообщества МЭЯ-АР может служить в качестве инокулята для успешного запуска МЭЯ-АР. Например, было показано, что в результате предварительного экспонирования сообщества микроорганизмов к электропроводящим материалам, в частности, в среде с ГАУ, последующее примене-

ние такого инокулята в МЭЯ-АР вызвало положительный эффект [51]. Инокулят из природного болотного ила с большим количеством гидрогенотрофных метаногенов показал более высокое производство метана в МЭЯ, чем анаэробный ил из АР, содержащий, главным образом, ацетокластические метаногены [52]. Исследование микробного состава биопленок биокатодов в АР, инокулированных различными культурами активного ила (гидрогенотрофными метаногенами, ацетогенами, сульфатредукторами, денитрификаторами и ацетокластическими метаногенами) продемонстрировало, что в зависимости от присутствия в среде различных донора и акцептора электронов сформировались различающиеся микробные сообщества. Примечательно, что представители рода *Methanobacterium* появились на всех биокатодах с первоначально разными инокулятами, тем самым было подтверждено, что это ключевой микроорганизм, участвующий в реакциях, протекающих на биокатоде (уравнения 2, 3) [49]. Встраивание электродов в реактор анаэробного ила с восходящим потоком жидкости (АИВП, UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket) может компенсировать низкое содержание метаногенов при запуске этих реакторов [48].

Процесс ПМПЭ играет важную роль в анаэробном разложении органических веществ, а скорость этого процесса в синтрофных консорциумах микроорганизмов увеличивается при электрическом воздействии на систему. Однако влияние процесса ПМПЭ на микробное разнообразие не является однозначным, поскольку некоторые исследования подтвердили снижение разнообразия в результате стимуляции ПМПЭ, а в других, наоборот, отмечалось увеличение микробного разнообразия при стимулировании этого процесса [15].

Для МЭЯ-АР с субстратом в виде простых ЛЖК электроактивные представители рода *Geobacter* являются одними из доминирующих микроорганизмов [18, 53]. Они были представлены и в анодной и катодной биопленках, а также в планктонной биомассе при росте на ацетате в МЭЯ с внешним напряжением 0.8 В [37]. Рост экзоэлектрогенных бактерий, особенно видов *Geobacter*, ускоряется в МЭЯ-АР, что приводит к улучшению разложения субстратов [54]. Такое увеличение количества *Geobacter* в МЭЯ-АР совпадает с фактическими данными в ходе исследований ПМПЭ в анаэробных реакторах, где также были обнаружены представители *Geobacter* и метаногенных архей *Methanosaeta* на поверхности ГАУ и других проводящих материалов, и, соответственно, отмечалось увеличение производства метана [51, 55]. Для двух модельных организмов *Shewanella oneidensis* и *Geobacter sulfurreducens* изучали молекулярные механизмы способности экзоэлектрогенов к ВПЭ благодаря наличию большого количества мультигемных цитохромов с-ти-

па (МН-сytCs), которые обеспечивают транспорт электронов от внутренней мембраны к внешней. Метатранскриптомный анализ и реконструкция метаболического пути показали, что доминирующие микроорганизмы *Geobacteriaceae* регулировали ВПЭ и метаболические пути в ответ на изменения поверхностного окислительно-восстановительного потенциала и источника углерода. Представители *Geobacter* способны непосредственно передавать электроны электротрофным метаногенам в реакторе АИВП посредством ПМПЭ [6, 19]. Использование сложных субстратов (например, осадок сточных вод, глюкоза и т.д.) приводило к более разнообразному сообществу с более высоким содержанием различных гидролитических/кислотогенных бактериальных видов, таких как анаэробные грамм-положительные *Bifidobacterium* (филум *Actinobacteria*) и *Levilinea* (филум *Chloroflexi*) [19].

Секвенирование гена *mcrA* показало, что электрическое воздействие 0.8 В в МЭЯ-АР вызывало смену доминирующих в биопленке на катоде архей с ацетокластических (в основном *Methanosarcina mazei* LYC) на гидрогенотрофные метаногены (в основном алкалофильные *Methanobacterium alcaliphilum*). Доля *Methanobacterium alcaliphilum* на аноде, в среде и на катоде составляла 37.63, 71.03 и 41.10% соответственно, а снятие внешнего потенциала приводило к снижению численности этих архей. В целом, приложенное внешнее напряжение не только влияло на увеличение количества и разнообразия микроорганизмов, включая экзоэлектрогенов (*Geobacteriaceae*, *Clostridiaceae*) и метаногенов, но также изменяло состав бактериального и архейного сообщества. При подаче электрического напряжения можно было проследить методом тепловых карт заметное увеличение в биопленках анода *Geobacteriaceae*, а на катоде базофильных клостридий рода *Alkaliphilus* и гидрогенотрофных архей *Methanobacterium alcaliphilum*. При прекращении подачи электричества численность этих микроорганизмов в МЭЯ-АР снижалась, следовательно состав микробного сообщества определяется электрическим воздействием на МЭЯ-АР [37].

По сравнению с контрольным АР в реакторе МЭЯ-АР с пропионатом в качестве единственного источника углерода количество анаэробных синтрофных пропионат-окисляющих бактерий рода *Smithella* (филум *Proteobacteria*) увеличилось с 2 до 9% и возросла численность *Geobacter sulfurreducens*, *Bifidobacterium* и *Clostridium* (филум *Firmicutes*), разлагающие сложные органические отходы до H₂ и ацетата, имели более высокую относительную численность 38.2 и 21.1% соответственно в МЭЯ-АР, по сравнению с АР – 13.7 и 13.2% соответственно [56]. В свободноплавающей биомассе в большинстве случаев преобладали различные гидролитические/кислотогенные бакте-

рии, такие как *Bifidobacterium*, *Cloacamonas* и *Pseudomonas* [18].

Знание того, как производительность МЭЯ соотносится с изменениями в популяциях бактерий и связанными с ними метаболическими процессами, а особенно стадией ацетогенеза, важно для создания благоприятных условий в системе. В консорциумах микроорганизмов бактерии выступают в качестве биокатализаторов и обеспечивают энергоэффективность систем МЭЯ, поставляя субстраты метаногенным археям для образования метана. С одной стороны, бактерии могут участвовать в образовании водорода и/или убирать токсичный кислород из системы, с другой стороны, они могут негативно влиять на систему, синтезируя нежелательные продукты, например, ацетат.

Гомоацетогены, которые используют CO_2/H_2 для образования ацетата, часто обнаруживаются в МЭЯ [57]. Синтрофный ацетогенез часто рассматривался как узкое место, которое в значительной степени регулирует всю скорость анаэробного процесса [15]. *Acetobacterium* spp. и *Acetoanaerobium* spp. были обнаружены на слоистом катоде мембранного МЭЯ-АР, где ацетогенез и метаногенез происходили одновременно, и в этих процессах потреблялся водород, образуемый на катоде (уравнение 3) [40]. Автотрофные ацетатобразующие бактерии потенциально могут снизить энергетическую эффективность системы, поскольку ацетат, образуемый гомоацетогенными бактериями, растущими на катоде, может вызывать сбой в работе МЭЯ-АР и увеличение ХПК в эффлюенте МЭЯ-АР [40]. Роль синтрофных ацетогенов в МПЭ изучается также и для ускорения анаэробной деградации органических веществ. Важными являются исследования параметров роста и роли ОМПЭ и ПМПЭ. Для ускорения ОМПЭ требуется поддержание низкого парциального давления водорода, а ПМПЭ может стимулироваться как внесением электропроводящих материалов, так и электрическим воздействием на систему [15]. Было показано, что ацетогенез доминировал при более низких потенциалах, а метаногенез – при более высоких, поэтому поддержание достаточно высоких значений катодных потенциалов является перспективным способом контроля ацетогенеза. Это позволило бы получать достаточное количество водорода и метана, а также ингибировать нежелательную активность ацетогенных микроорганизмов. Преимущественное развитие гидрогенотрофных архей рода *Methanobacterium* в среде с ацетатом показало возможное использование ацетата в большей степени экзоэлектрогенными бактериями, чем ацетокластическими метаногенами. Присутствие гомоацетогенов незначительно и их неблагоприятное воздействие на энергоэффективность МЭЯ-АР не велико, поскольку термодинамически производство ацетата

является более энергозатратным, чем образование метана гидрогенотрофным путем [40].

В МЭЯ-АР, перерабатывающем подвергнутый предварительному щелочному гидролизу активный ил, преимущественно развивались представители семейства *Geobacteraceae* и продуцирующие водород бактерии рода *Petrimonas* (филум *Bacteroidetes*). Представители архей рода *Methanocorpusculum*, образующие метан из CO_2 и H_2 , были доминирующими в сообществе (96.01%). Присутствие большого количества бактерий рода *Petrimonas*, известных как активные продуценты водорода, и архей рода *Methanocorpusculum* указывало на наличие гидрогенотрофного пути метаногенеза в МЭЯ-АР [58]. Состав микробного сообщества в МЭЯ-АР менялся при электрическом воздействии относительно контрольного АР. Так, *Methanobacterium beijingense* и *Methanobacterium petrolearium* были доминирующими видами гидрогенотрофных архей в контрольном АР, в то время как в МЭЯ-АР преобладали *Methanosarcina thermophila* и *Methanobacterium formicicum*, при этом в МЭЯ-АР выход метана увеличивался на 70%. Следует отметить, что представители рода *Methanosarcina* являются уникальными метаногенами, способными переключаться между ацетокластическим и гидрогенотрофным метаногенезом. Существенных различий в доминирующих бактериальных видах в АР и МЭЯ-АР не наблюдалось. В обоих реакторах бактерии класса *Clostridia* были представлены в большем количестве, чем класса *Bacteroidia*. По сравнению с контрольным АР, МЭЯ-АР демонстрировал увеличение общей популяции бактерий на 40%, лучшее разложение органических веществ до ЛЖК. Также, наблюдалось изменение состава метаногенных архей и увеличение производства метана [39].

Метагеномный и метатранскриптомный анализы используются для выяснения биологических механизмов передачи электронов от электрода к клетке и межклеточного переноса электронов. Анализ катодной биопленки показал наличие популяции архей преимущественно рода *Methanobacterium* (>70% видов) в активном состоянии. Эта архея являлась основным производителем метана в двухкамерном МЭЯ при приложенном напряжении 1 В. С целью изучения предполагаемых механизмов передачи электронов и обнаружения участвующих в этом процессе ферментов *Methanobacterium*, определяли кратковременные изменения уровней экспрессии шести генов *ehaB*, *ehbL*, *mvhA*, *hdrA*, *frhA* и *hypD*, кодирующих белки: [NiFe]-гидрогеназ (*Eha*, *Ehb* и *Mvh*), гетеродисульфидредуктазы (*Hdr*), кофермент F_{420} восстанавливающей [NiFe]-гидрогеназы (*Frh*), а также белка созревания гидрогеназы (*HypD*). Наблюдалось небольшое увеличение относительной экспрессии четырех из этих генов (*ehaB*, *ehbL*, *hdrA* и *hypD*) при воздей-

ствии электричества. Для того, чтобы подтвердить наблюдаемую тенденцию и включить в исследование другие белки: ферредоксины или белки пили, вероятно, участвующие в электрометаногенезе в *Methanobacterium*, необходимо проведение дополнительных исследований [59].

Полученные данные о влиянии электрического воздействия на микробное сообщество МЭЯ-АР являются важными для понимания и применения электрометаногенеза при очистке сточных вод. На аноде происходит рост представителей семейства *Geobacteraceae*, на катоде развиваются гидрогенотрофные метаногены. Для ускорения анаэробного разложения органических веществ и увеличения производства метана также большое значение имеют планктонные микроорганизмы.

Предварительная электрическая обработка субстрата перед анаэробным сбраживанием. Анаэробное разложение органических веществ метаногенным сообществом бактерий и архей проходит несколько стадий: гидролиз – разложение сложных полимерных субстратов на более простые; кислотогенез (брожение) – сбраживание мономеров до ЛЖК, а также спиртов метанола и этанола; ацетогенез – разложение ЛЖК, спиртов и некоторых других соединений, образовавшихся на предыдущих этапах, до H_2 , CO_2 и ацетата, включая также деградацию ацетата; метаногенез – образование биогаза, состоящего в основном из метана и углекислого газа, а также небольшого количества водорода и других примесей [13].

Направление реакций в анаэробном сообществе меняется в зависимости от преобладающих концентраций субстратов и продуктов в среде, и кинетика самой медленной стадии обычно определяет общую кинетику процесса [60]. Микробиология анаэробной деградации сложная в связи с участием нескольких групп микроорганизмов, каждая из которых имеет собственные оптимальные условия роста. Эти группы чувствительны к потенциально ингибирующим параметрам процесса, таким как рН, щелочность, концентрация свободного аммиака, водорода, натрия, калия, тяжелых металлов, ЛЖК и других. Основными факторами, ограничивающими более широкое применение анаэробного сбраживания, являются низкие скорости превращения отходов в метан, невысокая эффективность (50–70% теоретического выхода метана для обычных анаэробных реакторов), восприимчивость к токсичным соединениям и высоким нагрузкам по органическому веществу [12, 13]. Гидролиз комплексного субстрата, состоящего из твердых органических частиц, признан одной из основных лимитирующих стадий анаэробного процесса. С целью ускорения анаэробного разложения и увеличения производства биогаза следует использовать различные предварительные механические, тепловые, химические и биологиче-

ские методы обработки субстрата для обеспечения его последующей биодеградации [19, 38].

Предварительная электрическая обработка сложного сырья используется для улучшения его дальнейшего анаэробного разложения. Например, применение импульсного электрического поля для предобработки разных типов биомассы (свиной навоз, ОСВ, избыточный активный ил) показало хорошие результаты, поскольку в среду высвобождалось больше внеклеточных полимерных веществ, субстрат становился менее вязким и скорость его деградации увеличивалась. Предварительный электрический гидролиз (электрофорез, электроосмос и омический нагрев) отходов лигноцеллюлозы в шламе целлюлозно-бумажного комбината приводил к увеличению производства метана на 13%, поскольку происходил распад частиц лигноцеллюлозы с высвобождением полимеров в среду [61]. Приложение более высоких напряжений 0.9, 1.2 и 1.5 В ускоряло процесс гидролиза комплексных органических веществ анаэробного ила с накоплением ЛЖК и приводило к подкислению среды. Возможно, это связано с возникновением микроаэробных условий вследствие электролиза воды с выделением водорода на катоде и кислорода на аноде при 1.2 и 1.5 В. При небольших напряжениях 0.3 и 0.6 В ЛЖК также образовывались, но в меньших количествах и быстрее потреблялись [38].

При обработке в аппарате вихревого слоя, в котором осуществляется комплексное воздействие на субстрат, в том числе электромагнитным полем, было показано последующее повышение эффективности метанового сбраживания модельных органических отходов [62], ОСВ [63], органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) [64], эффлюента метантенка при его рециркуляции [65].

Полученные экспериментальные данные о положительном влиянии электрической обработки субстратов открывают новые возможности для применения подобной экологически чистой и эффективной предобработки отходов для последующего ускорения анаэробной биодеградации.

Влияние рабочих параметров на эффективность МЭЯ-АР. Величина приложенного к системе электрического напряжения. Оптимизация величины подаваемой внешней электрической энергии путем приложения разности потенциалов к системе и генерации электрического тока играет ключевую роль в формировании продукта (CH_4) и снижения ХПК [16]. Изменение внешнего напряжения МЭЯ может также косвенно влиять на рН из-за абиотических реакций на поверхности электрода [66].

Изучение электрометаногенеза в основном проводили при прикладываемом напряжении к МЭЯ-АР в диапазоне 0.3–1.5 В. Однако на осно-

вании полученных данных оптимальное значение приложенного напряжения для максимальной производительности процесса электрометаногенеза не является однозначной величиной, и диапазон колебаний оптимальных значений составляет от 0.1 до 1.0 В [19].

Хотя минимальный электрический потенциал на катоде для образования метана составляет -0.24 В, в большинстве работ используют более отрицательный потенциал катода [26]. Анализ воздействия различных подаваемых в систему напряжений на производство CH_4 из различных органических отходов показывает, что небольшой (-0.3 – 1.8 В относительно СВЭ) электрический потенциал приводил к значительным увеличениям выхода CH_4 (20–1360%), при этом оптимальный диапазон может быть -0.3 – 1.4 В или -0.2 – 0.8 В относительно СВЭ. Для разложения глюкозы и активного ила, используя диапазоны -0.5 – 1.5 В и -0.6 – 1.2 В относительно СВЭ, экспериментально установлено, что оптимальными были -1.0 и -0.8 В, соответственно. Показано, что напряжение до 2 В, поданное в систему, может увеличить как общий выход метана, так и его содержание в биогазе, несмотря на повышенный риск сбоя из-за электролиза и повреждения клеток микроорганизмов [15]. В МЭЯ-АР скорость образования метана при 55°C с ацетатом в качестве субстрата (0.8 г/л) зависела от прикладываемого к углеродным электродам электрического потенциала и увеличивалась в 13 раз с 1347 ммоль л^{-1} сут $^{-1}$ до максимума $17\ 653$ ммоль л^{-1} сут $^{-1}$ при изменении напряжения в системе с 0.4 до 0.8 В [50].

При исследовании влияния величины приложенного напряжения (0.5; 0.7; 1.0 и 1.5 В) на биоэлектрохимическую продукцию метана при приложенном напряжении 1.0 В были получены самые высокие выходы метана из глюкозы равные 408.3 мл CH_4 /г ХПК, что было на 30.3% выше, чем в контроле (313.4 мл CH_4 /г ХПК), при этом также наблюдалось ускорение процесса гидролиза при применении МЭЯ по сравнению с АР [67]. Экспериментальные результаты работы лабораторных реакторов на синтетической сточной воде с углеродной тканью в качестве катода и анода при приложенных напряжениях 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 В показали, что эффективность удаления ХПК (2–3 г/л) и выход метана увеличивались при увеличении напряжения до диапазона 0.8–1.0 В, а при более высоком напряжении эффективность работы МЭЯ снижалась. При 1 В эффективность снижения ХПК была больше на 5%, чем при 0.8, но авторы с учетом экономической составляющей предложили считать 0.8 В оптимальным напряжением для очистки сточных вод с применением МЭЯ [68].

При проверке влияния низкого напряжения (0.05–0.2 В) как более экономичного для ускорения процесса анаэробного разложения, наилуч-

шие результаты были получены при напряжении 0.10 В, при этом удаление ХПК (5.8 г/л) с ЛЖК в качестве субстрата увеличивалось на 16.72% в первые 6 ч, а общее выделение CH_4 увеличилось на 23.39%. Средний выход метана в МЭЯ-АР был на 15.69% выше, чем в контрольном АР [69].

Скорости разложения ацетата и бутирата были значительно увеличены в МЭЯ с биоанодом из графита при напряжении 0.5 В, по сравнению с АР без электрического воздействия [41].

По сравнению с контролем, производство метана из ОСВ в МЭЯ с железграфитовым электродом при приложенном напряжении 0.3 В увеличивалось на 22.4%. Однако при возрастании напряжения до 0.6 В производство метана уменьшалось и на катоде наблюдалось образование водорода. При более высоком напряжении 0.6 В чрезмерное абиогенное образование из H^+ водорода на катоде (уравнение 3) приводило к подщелачиванию среды до значений pH 9.1, что ингибировало метаногенез [70]. Также были получены данные об отсутствии влияния напряжения в этих пределах на снижение ХПК или увеличение производства метана, следовательно, важно установить верхний предел напряжения и подобрать оптимальные значения напряжения с учетом энергоэффективности процесса [18, 71].

При приложенном напряжении 0.3 В наблюдалась быстрая стабилизация метаногенеза от запуска до достижения стационарного режима без снижения pH или накопления ЛЖК, а также увеличение скорости производства метана из высококонцентрированных пищевых отходов. Однако выход CH_4 было одинаковым для МЭЯ-АР и контрольного реактора [72]. Отмечено, что разные напряжения влияют на разные стадии анаэробного разложения, например, 1.2–1.5 В ускоряют стадию гидролиза, а 0.3–0.6 В – стадию брожения [38]. В отдельных исследованиях скорость удаления ХПК и образования метана не отличались при двух разных приложенных напряжениях для ацетата и глюкозы в качестве субстрата, например, 0.4 и 1.0 В при разложении ацетата, а для глюкозы в экспериментах с 0.3 и 0.6 В, а также 0.5 и 0.8 В [18, 32].

Показано, что выход метана при разложении глюкозы или ЛЖК зависел от количества анаэробных планктонных микроорганизмов в жидкой среде, а не на поверхности биоэлектрода при приложенном напряжении 0.5 В. В результате электрического воздействия возросло количество электроактивных анаэробных планктонных микроорганизмов в жидкой среде. В отсутствии планктонной биомассы в МЭЯ-АР скорости и выход метана из поляризованного биоэлектрода снижались, в то время как производство водорода увеличивалось. Таким образом, было показано, что электроактивные планктонные микроорга-

низмы вносят значительный вклад в производство метана в АР с поляризованными электродами [73]. В ряде исследований подтверждена важная роль планктонных микроорганизмов, когда при воздействии приложенного напряжения происходило изменение состава консорциума микроорганизмов и увеличение метаболической активности. Эффективный вклад в повышение ПМПЭ, по-видимому, больше связан с планктонными микроорганизмами в среде, чем с биопленкой на электродах, так как в нескольких исследованиях количество CH_4 , выделяемого на электродах, было значительно меньше, чем из жидкой среды [15, 42, 74].

В работах [35, 75–77] проводили изучение системы МЭЯ-АР при более высоких напряжениях, чем традиционно применяемые в МЭЯ. При подаче внешнего напряжения 0.6–1.8 В в МЭЯ-АР для получения метана из ОСВ, предварительно подвергнутых термощелочному гидролизу, при 1.8 В было получено наибольшее увеличение образования метана (79.3%) и, важно отметить, что не наблюдалось электролиза воды [75]. Приложенное напряжение 2.0 В приводило к электролизу воды, однако, при этом были получены на 25% больший выход CH_4 и на 37.2% более высокое содержание CH_4 в биогазе при использовании смеси пектина и декстрина в качестве субстрата [76]. Использование МЭЯ-АР с приложенным напряжением 2.5 В и с системой удерживания биомассы на биокатоде позволяло значительно увеличить стабильность (не наблюдалось электролиза воды) и эффективность анаэробного сбраживания, в частности скорости образования (на 38.8%) и удельного выхода (на 40.5%) метана и плотности тока (на 233%), в двухстадийном процессе анаэробного сбраживания модели ОФ-ТКО [77]. При приложенном напряжении 2.75 В в системе МЭЯ-АР с добавлением ГАУ наблюдали устойчивое производство метана (>300 мл CH_4 /г ХПК) из пищевых отходов [78]. Процесс анаэробного сбраживания модели ОФ-ТКО в МЭЯ-АР исследовали при установленных силах тока 100, 200 и 500 мА, при этом напряжение между электродами составляло 2.5, 3.2 и 6.3–7.2 В, соответственно. При максимальном токе (500 мА), в биогазе детектировали кислород, концентрация которого достигала в некоторые моменты 0.44–0.59%, что указывало на наличие электролиза воды. В то же время чистый выход метана после вычета количества метана, эквивалентного затраченной электроэнергии, в биореакторе с силой тока 500 мА (6.3–7.2 В) был наибольшим и составил 6.4% [35]. Таким образом, несмотря на повышенную вероятность электролиза воды, высокое напряжение может улучшать характеристики электрометаногенеза.

В последнее время был проведен ряд исследований влияния прерывистой подачи электричества на

работу МЭЯ-АР. Периодическое отключение электропитания (подача 2 с, перерыв на 2 с) увеличивало долгосрочную производительность МЭЯ-АР, при этом внутреннее сопротивление снижалось при длительном манипулировании включениями/выключениями [79]. Эти результаты указывают на то, что прерывистая подача электричества может сделать МЭЯ-АР более устойчивым, практичным и экономичным, в то же время данный феномен требует дальнейшего изучения.

Таким образом, подбор оптимального приложенного электрического напряжения к МЭЯ-АР является определяющим фактором эффективности анаэробного разложения органических отходов. Отмечено, что даже небольшое напряжение 0.1 В может улучшать характеристики электрометаногенеза. Однако следует учитывать, что приложение более высокого напряжения одновременно требует большей потребляемой мощности, что может снизить энергетические выгоды от дополнительного образования метана в МЭЯ-АР.

Требования к электродам. Важным фактором микробиологического биоэлектрокатализа является электрохимическая связь между микроорганизмами и поверхностью электродов. Прогресс в биокатализе в отношении выбора материалов электродов направлен на анализ поверхностных характеристик для улучшения биосовместимости, оптимизацию величины площади электрохимической поверхности для обеспечения высоких скоростей переноса электронов, проводимости и массопереноса между субстратами и продуктами [80]. Стоимость, материал, поверхность и конфигурация электродов являются крайне важными для эффективной работы реакторов и для достижения рентабельной и масштабируемой технологии. Для развития активной гомогенной биопленки к электродам МЭЯ-АР применяют следующие требования: большая площадь поверхности, высокая электропроводность, хорошая биосовместимость и стабильность в устойчивых условиях окружающей среды, экономичность. Эффективность переноса электронов на границе раздела фаз микроорганизмы–электрод играет ключевую роль в работе биоэлектрохимических систем. Рост и образование биопленок на электроде определяются свойствами его поверхности, влияющими на образование связей между микроорганизмом и электродом, например, силы Ван-дер-Ваальса, водородной связи или электростатического взаимодействия. Быстрый рост биопленки наблюдался при положительном заряде поверхности электрода, что связано с отрицательным зарядом поверхности микроорганизмов. Кроме того, пористые и наноразмерные материалы усиливают образование биопленки и являются идеальным каркасом для прикрепления и роста микроорганизмов. Оптимизированная топография и химия поверхности электродов об-

легчают присоединение электроактивных микробных клеток и развитие биопленок и, таким образом, оптимизирует электрохимическую связь между бактериальными клетками и электродами, обеспечивая условия для улучшения скорости переноса электронов от микроорганизмов к электродам [15, 80, 81].

Композитные материалы, сочетающие высокую проводимость с шероховатой поверхностью, обеспечивающей адгезию микроорганизмов и рост биопленки, являются наиболее перспективными. В большинстве случаев это подразумевает сочетание металлической основы с углеродным покрытием с определенной топографией и химией. Материалы из углерода являются наиболее используемыми электродными материалами благодаря свойствам углерода, низкой стоимости, высокой проводимости и наличию поверхности, способствующей образованию биопленки. Так, например, недорогие низкорепертивные углеродные листы и углеродная ткань использовались в качестве катода и анода [35, 43, 77]. Углеродные материалы, особенно графитовые трехмерной структуры имеют преимущество перед металлическими электродами с точки зрения стоимости, устойчивости к условиям окружающей среды и более низкой токсичности для микроорганизмов. В целом, эффективность биоэлектрода определяется биосовместимостью, гидрофильностью, положительным поверхностным зарядом и обширной площадью поверхности [15, 81].

Хотя в качестве электродного материала чаще всего используется углерод, он придает поверхности электрода гидрофобные свойства, и это часто вызывает плохую адгезию микроорганизмов и/или белков, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, и приводит к ограниченной способности к переносу электронов. Были разработаны различные стратегии иммобилизации окислительно-восстановительных ферментов на электродах, а также модификации поверхности электродов с помощью нанокompозитов оксидов металлов и/или проводящих конъюгированных полимеров для улучшения кинетики переноса электронов, биосовместимости и/или адгезии клеток [80]. Также перспективным является улучшение образования биопленок на гладкой поверхности углеродной ткани за счет снижения скорости движения биомассы в непосредственной близости от поверхности электродов путем создания физического барьера [77].

Улучшение поверхностных свойств катодов на основе углерода путем нанесения слоев катализатора, состоящих из наноматериалов, оказалось превосходной стратегией для повышения общей производительности системы. Кроме того, среди различных конфигураций МЭЯ-АР многокамерные варианты показали лучшие результаты по увеличению содержания метана в биогазе [81].

Однако сложность системы и высокая стоимость изготовления являются возможными недостатками при вводе в эксплуатацию крупных реакторов, поэтому необходимо стремиться к простоте изготовления и удобной конструкции.

Модификация катода с добавлением положительно заряженных частиц, таких как хитозан, или с увеличением площади поверхности раздела с использованием пористого трехмерного каркасного электрода приводила к увеличению потребления тока [30]. Наночастицы магнетита ускоряли анодное электрогенное окисление органических субстратов, в первую очередь ЛЖК путем стимулирования процессов ПМПЭ между синтрофами и метаногенами [82]. Применение объемного анодного электрода из компонентов углеродной сетки имело преимущество по сравнению с углеродной щеткой и ГАУ. 3D углеродная сетка стимулировала микробную активность и рост представителей *Geobacter*, а также является экономичной для практического применения [83].

Максимальная скорость производства метана из ОСВ в МЭЯ-АР увеличивалась на 45% при применении многослойного катода из никелевой пены и анода в виде углеродной щетки. Ключом к улучшению процесса метаногенеза считалась работа высокоэффективного метаногенного биокатода, который регулировал пространственное распределение метаногенов как во взвешенной биомассе, так и прикрепленной на электродах. Увеличение площади поверхности катода до определенной степени может ускорить общие электрохимические процессы, но плотность катодного тока уменьшается при увеличении площади поверхности катода, что приводит к уменьшению выделения водорода на катоде, которое может иметь решающее значение для образования катодной биопленки. Многослойность катода не может служить гарантией увеличения выхода метана. Так, наибольший выход метана при внешнем напряжении 0.8 В был в 1.4 раза выше, чем в контроле АР при использовании в МЭЯ-АР четырехслойного катода, а не 8- или 12-слойного. Ацетокластические метаногены в основном были сконцентрированы на аноде, в то время как гидротрофные метаногены находились на катоде и количество метаногенов в жидкой среде/осадке было самым низким среди вариантов эксперимента. Таким образом, оптимальная конфигурация четырехслойного биокатода могла быть основной причиной усиления метаногенеза [45].

Таким образом, подбор оптимальных экономических материалов и конфигурации катода играет основную роль в обеспечении эффективного электрометаногенеза.

Расположение электродов. Для эффективной работы МЭЯ исследуются разные конфигурации реакторов с учетом расположения электродов, а также

расстояния между катодом и анодом. Например, лучшие характеристики процесса наблюдались для реакторов с электродами, помещенными в донную зону с высокой концентрацией ила, по сравнению с реакторами с электродами, размещенными наверху, что объяснялось улучшением процесса ПМПЭ. При гидравлическом времени удержания 36 ч и максимальной генерации тока 10 мА скорость снижения ХПК была максимальной и составляла 92.1%, при этом скорость образования метана и выход метана составляли $304.5 \text{ мл л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ и 275.8 мл/г ХПК , соответственно. Метаногены и экзоэлектрогены накапливались в больших количествах в биопленках электродов в реакторах с расположенными снизу электродами [84, 85].

Расстояние между анодным и катодным электродами является важным параметром, который может влиять на производительность микроорганизмов в электрохимической системе. Считается, что недостатком двухкамерной конфигурации МЭЯ с мембранным сепаратором является большое расстояние между электродами, что приводит к значительным перенапряжениям, а наличие мембраны приводит к дисбалансу рН между двумя камерами и, следовательно, увеличивает потери напряжения. Чтобы преодолеть эти ограничения, были разработаны однокамерные безмембранные МЭЯ, использование которых оптимизировало увеличение чистого тока для получения метана [19]. В то же время слишком маленькое расстояние между электродами может привести к засорению доступного пространства, что, в свою очередь, может повлиять на массоперенос и в конечном итоге, приведет к сбою процесса [86].

В двухкамерной МЭЯ-АР, состоящей из двух АР-систем, разделенных анионообменной мембраной с катодом, помещенным во внутренний цилиндр (катодный АР) и анодом на внешний цилиндр (анодный АР), ХПК (глюкозы) снижалось на 15% по сравнению с контролем. В катодном АР средняя скорость производства метана достигала $0.07 \text{ мл СН}_4/\text{мл реактора сут}^{-1}$, что в 2.59 раза выше, чем в контрольном АР. Показано, что эффект от увеличения выхода метана полностью покрывает затраты на электроэнергию для МЭЯ-АР [71]. В частности, после вычета количества метана, эквивалентного затраченной электроэнергии на питание электродов, чистый суточный прирост выхода метана составил 4.0 и 6.4% при силе тока 200 и 500 мА [35].

Таким образом, оптимизация положения электрода в реакторах, конфигурация и площадь поверхности играют решающую роль в производительности МЭЯ и распределении микробного сообщества в биопленках на электродах.

Температура. Температура – очень важный параметр, влияющий на работу МЭЯ-АР, и подбору оптимальной температуры для ускорения

электрометаногенеза и экономического обоснования применения данной технологии следует уделить особое внимание. Было показано, что с приложенным внешним напряжением в мезофильных условиях сокращалось гидравлическое время удержания в МЭЯ-АР за счет стимулирования гидрогенотрофного метаногенеза [29]. Известно, что в АР в мезофильных условиях метан образуется главным образом из ацетата (70%), а при повышении температуры наблюдается переключение пути образования метана на гидрогенотрофный, вероятно, за счет более быстрой генерации гидрогенотрофных и вытеснения ацетокластических метаногенов [87]. Как было продемонстрировано в ряде работ, в системах МЭЯ-АР в мезофильных условиях чаще всего доминируют гидрогенотрофные метаногены [40, 56, 58].

Оптимально подобранная для работы МЭЯ-АР температура поможет избежать разбалансировки системы, сопровождающейся накоплением ЛЖК и снижением рН, когда, например, анаэробное брожение не будет сопровождаться энергетически эффективным производством метана. При разложении ОСВ в однокамерном МЭЯ-АР при напряжении 0.3 В повышение температуры от 30°C до 40°C приводило к линейному увеличению эффективности удаления летучих взвешенных веществ. Максимальный выход метана из ОСВ составлял $139.2 \text{ л СН}_4/\text{кг летучих взвешенных веществ}$ при плотности тока $1.63 \pm 0.11 \text{ А/м}^2$ и температуре 35°C . В то же время плотность анодного тока снижалась на 23.5%, когда рабочая температура увеличилась с 35 до 40°C . Эти результаты показывают, что более высокая температура может ингибировать активность экзоэлектрогенных бактерий на аноде и приводить к снижению образования метана в МЭЯ-АР. Температура 35°C была оптимальной для образования метана из ОСВ с использованием МЭЯ, так как влияние электричества на работу системы снижалось при более высокой температуре [88].

При пониженных температурах (20°C) низкоконцентрированные сточные воды, содержащие глюкозу в качестве источника углерода, обрабатывались в МЭЯ с графеновым/полипиррольным электродом, при этом в биопленках электродов отмечалось доминирование гидрогенотрофных метаногенов [89]. Оптимизация рабочей температуры важна также, чтобы сбалансировать активность микроорганизмов, участвующих в различных биохимических стадиях в МЭЯ-АР: гидролиз, брожение, анодное дыхание и метаногенез. Биоэлектрохимическое анаэробное разложение ОСВ со гидравлическим временем удержания 10 сут при температуре окружающей среды 25°C имело такие же показатели удаления взвешенных твердых веществ как и в мезофильных условиях

при 35°C. Энергоэффективность работы МЭЯ-АР при температуре окружающей среды 25°C была значительно выше, чем в мезофильных условиях за счет отсутствия энергозатрат на нагревание системы [85]. При 10°C выход CH_4 в МЭЯ-АР был в 5.3–6.6 раз выше, чем в АР без внешнего напряжения, а затраты на подачу электроэнергии в МЭЯ-АР оказались ниже, чем потребовались бы для нагрева АР до мезофильных условий для достижения соразмерного выхода метана [90].

Таким образом, использование биоэлектрохимических систем при температуре окружающей среды без дополнительного подогрева можно рекомендовать для обработки органических отходов, включая ОСВ, в умеренных и холодных климатических районах для экономии тепловой энергии.

Субстраты и нагрузка по органическому веществу. Для исследования анаэробной переработки в МЭЯ-АР использовали различные субстраты, такие как ацетат, глюкоза, осадки сточных вод, личаты, бытовые сточные воды, пищевые отходы и др. Системы МЭЯ-АР показали большую стабильность процесса по сравнению с традиционными АР за счет отсутствия накопления короткоцепочечных ЛЖК при более высоких концентрациях органического вещества, а также уменьшения ингибирующих эффектов различных токсичных соединений [20] (табл. 1). При сравнении классического АР и МЭЯ-АР скорость получения метана и время стабилизации реактора МЭЯ-АР были приблизительно в 1.7 и 4.0 раза выше, чем в реакторе АР, за счет более быстрого разложения органических веществ. Однако интересно, что общий выход метана в обоих реакторах был аналогичен теоретическому максимальному выходу. Исходя из этих результатов МЭЯ не увеличивал выход метана по сравнению с теоретическим, а ускорял его выработку посредством биоэлектрохимических реакций [91]. При 0.8 В скорость производства метана из ацетата в МЭЯ-АР составила 138 мл CH_4 /л реактора сут⁻¹. По сравнению с контрольным АР, в котором скорость производства метана составляла 46 мл CH_4 /л реактора сут⁻¹, в МЭЯ-АР показано увеличение скорости образования метана в 3 раза [74].

Основным фактором, ограничивающим практическую применимость технологии анаэробного сбраживания, является относительно высокое гидравлическое время удержания, что снижает эффективность реакторов [61]. МЭЯ-АР был опробован для процесса с высокой нагрузкой 28 кг ХПК м⁻³ сут⁻¹ и коротким гидравлическим временем удержания 6 ч. Анализ основных микроорганизмов, участвующих в процессе разложения органических соединений, показал, что в реакторе с подачей электричества увеличивалось количество гидрогенотрофных метаногенов на катодной биопленке и в суспендированном иле. При этом в

МЭЯ-АР было достигнута высокая степень потребления глюкозы (71.0 против 42.3% в контрольном АР), увеличилось производство CH_4 (248.5 против 51.3 мл/ч в контрольном реакторе), повысился энергетический выход процесса за счет возросшего производства CH_4 . Это исследование продемонстрировало, что МЭЯ-АР может увеличить производство CH_4 и удаление органического вещества при коротком гидравлическом времени удержания, что повышает экономическую целесообразность очистки сточных вод [56].

Приложение потенциала к проводящим материалам хотя и увеличивало количество связанных с ПМПЭ экзоэлектрогенов и метаногенов, в то же время могло вызывать ухудшение характеристик процесса при увеличении концентрации органического вещества (этанол) [92]. Некоторые авторы рекомендуют применять МЭЯ-АР для очистки низкоконцентрированных сточных вод [21]. ЛЖК в качестве субстрата могут разлагаться как посредством анодного окисления, так и ацетокластического метаногенеза, которого следует избегать, поскольку он может уменьшить образование и перенос электронов между двумя электродами, тем самым снизить кулоновскую эффективность МЭЯ. Свободная энергия Гиббса окисления ацетата на аноде в 6 раз выше свободной энергии Гиббса ацетокластического метаногенеза, поэтому последний трудно осуществить при низких концентрациях органических веществ. С увеличением концентрации органических веществ, из-за наличия дополнительного донора электронов, доля ацетокластического метаногенеза будет постепенно возрастать и даже заменять анодное окисление, и может стать доминирующим путем разложения ацетата. Таким образом, энергетическая эффективность процесса может быть улучшена при использовании МЭЯ-АР для очистки низкоконцентрированных сточных вод [48]. В то же время, положительные результаты применения систем МЭЯ-АР для различных высококонцентрированных (>8 г ХПК/л) субстратов показали, что эта технология является перспективной для увеличения выхода метана из самых разнообразных субстратов [20].

В настоящее время активно проводятся исследования и применяются новые подходы к ускорению ПМПЭ при получении метана из ацетата и при восстановлении диоксида углерода до метана. В МЭЯ-АР содержание CH_4 в биогазе может достигать 80–95% благодаря более полному потреблению CO_2 [19]. Одним из возможных решений хранения избыточной электроэнергии, производимой из возобновляемых источников энергии, является новая технология **BEP2G** (Bioelectrochemical power-to-gas, биоэлектрохимическая энергия – газ). Технология основана на производящем метан МЭЯ, состоящем из двух отсеков, анодного, в кото-

ром протекает реакция окисления, и катодного отсека, в котором образуется метан. В большинстве случаев в таких МЭА используется также катион-обменная мембрана. В технологии ВЕР2G диоксид углерода и электрическая энергия преобразуются в метан с использованием электродов, которые поставляют метаногенным археям электроны или водород. Анализ и оценка расхода энергии, а также производительности показывают, что ВЕР2G может стать привлекательной альтернативой для термохимического метанирования и биохимического метаногенеза. Чтобы определить, может ли ВЕР2G стать будущей технологией “энергия-газ”, необходимо преодолеть проблемы, связанные с катодными потерями энергии, выбором подходящего донора электронов, эффективной конструкцией/работой реактора и опытом работы с крупными реакторами [31].

Изучение процессов, происходящих в системе МЭА, идет быстрыми темпами, проводятся крупномасштабные эксперименты, однако, МЭА далеко не является отработанной технологией; остаются различные проблемы, главным образом технико-экономического характера (стоимость материалов, безопасность и др.) [33]. Применение МЭА для очистки муниципальных сточных вод может привести к снижению затрат на очистку и уменьшению количества избыточного активного ила. В открытых данных есть сведения о пяти пилотных установках МЭА производительностью на 100–1000 л и о коммерческом полномасштабном реакторе EcoVolt компании “Cambrian Innovation” (США), используемом для очистки высококонцентрированных стоков [93].

Несомненно, за электрометаногенезом в МЭА-АР большое будущее, особенно для применения этой технологии при очистке сточных вод разного состава: от низкоконцентрированных бытовых стоков до высококонцентрированных промышленных сточных вод.

Дополнительное внесение электропроводящих материалов в МЭА-АР. Ряд исследований показывает, что внесение дополнительных электропроводящих материалов в систему МЭА-АР может служить в качестве промотора ПМПЭ и давать синергетический эффект [10]. В результате сравнения отдельных и комбинированных эффектов двух различных стратегий стимулирования ПМПЭ, а именно добавления электропроводящих материалов и приложения внешнего напряжения были получены интересные результаты. При повышенном напряжении от 1.25 В до 2.75 В система МЭА-АР с дополнительно внесенным ГАУ могла достичь стабильного производства метана (>300 мл CH_4 на г ХПК) из пищевых отходов, тогда как система МЭА-АР без внесения ГАУ при наиболее высоком напряжении (2.75 В) не работала. Микробный анализ показал, что улучшение характеристик систе-

мы МЭА-АР с внесением ГАУ совпало с более высокой относительной активностью экзоэлектродных бактерий, при этом *Methanospirillum* стал доминирующим видом метаногенов в биопленках на катоде и ГАУ. Эти наблюдения показывают, что ГАУ может усилить эффект и без того благоприятного сочетания МЭА и АР [78].

Два недавних исследования сочетания электропроводящих материалов и приложения внешнего напряжения (0.6 В) в АР непрерывного действия, обрабатывающих сточные воды молочных предприятий, показали, что обе стратегии были эффективны для повышения производительности и стабильности процесса. Добавление магнетита (20 мМ Fe) при коротком гидравлическом времени удерживания (до 7.5 сут.) оказывало стимулирующий эффект, аналогичный результату при объединении двух стратегий, а создание только внешнего напряжения мало влияло на выход метана. Количество разнообразных (предполагаемых) электроактивных микроорганизмов значительно увеличилось в условиях, способствующих ПМПЭ, особенно при добавлении магнетита. Внесение магнетита могло бы эффективно улучшить характеристики и стабильность анаэробного сбраживания за счет стимулирования основанных на ПМПЭ электросинтрофных микробных взаимодействий [94].

Аналогично было показано, что добавление щетки из углеродного волокна с большой удельной площадью является более эффективным методом улучшения характеристик анаэробного сбраживания, чем использование электродов МЭА с приложенным напряжением. В недавнем исследовании было использовано несколько конфигураций АР: первый АР был оснащен одним большим углеродным ершом без электродов, другие два АР содержали по половине ерша и два электрода с приложенным напряжением 0.8 В, один из которых работал в режиме замкнутой, а второй – разомкнутой цепи, четвертый АР работал по принципу МЭА, то есть обладал только двумя электродами с замкнутой цепью (без ерша). Все три конфигурации с половиной или полным ершом показали улучшенные характеристики процесса, о чем свидетельствовало повышение скорости образования метана на 57–82%. Объем удерживаемой биомассы был намного выше в АР с большим ершом, что, вероятно, способствовало быстрому потреблению ЛЖК и, следовательно, улучшению показателей процесса анаэробного сбраживания. В биопленках на ершах большого размера структура микробного сообщества отличалась от сообщества биопленки на электродах. На ершах преобладали представители рода *Methanotrix*, в то время как в биопленках электродов в большом количестве присутствовали представители рода *Geobacter* (анод) и *Methanobacterium* (катод). Таким образом, согласно этим исследованиям, до-

бавление электропроводящих материалов в АР может иметь преимущество перед электрическим воздействием [95].

Внесение электропроводящих материалов и электрическое воздействие на систему МЭЯ-АР ускоряет ПМПЭ и может давать синергический эффект, однако требуется проведение дальнейших исследований в данном направлении.

* * *

Способность микроорганизмов отдавать или принимать электроны с электродов легла в основу различных микробных электрохимических технологий, таких как МТЭ для выработки электроэнергии и МЭЯ для производства биотоплива: водорода и метана. В МЭЯ подается электрическая энергия от внешнего источника и, если основным газообразным продуктом на катоде является метан, этот процесс называется электрометанолизом. На аноде МЭЯ происходит процесс окисления органических веществ. Если в качестве основного источника углерода используются ЛЖК и ацетат, в анодных биопленках преобладают экзоэлектрогенные бактерии рода *Geobacter*. Электротрофные метаногенные археи, которые развиваются на катоде в МЭЯ-АР, обычно являются гидротрофными, а не ацетокластическими. Поскольку скорость метанолиза гидротрофными метаногенами выше, чем ацетокластическими, МЭЯ-АР характеризуются более высокой скоростью производства метана, по сравнению с классическими АР. Рекомендованное напряжение для электрометанолиза составляет 0.2–1.5 В, материалом электрода может быть углерод или металл, то есть не требуются дорогие платиновые электроды, как при электрогидрогенезе. Электрометанолиз происходит в мезофильных условиях и является эргономичной и экологичной биотехнологией очистки сточных вод.

МЭЯ-АР можно использовать как эффективный метод преобразования электричества в метан. Несмотря на то, что метан имеет более низкую плотность энергии, чем водород, его легче хранить, транспортировать и использовать. При применении возобновляемого источника энергии, такой как солнечная или энергия ветра, в качестве надежной технологии преобразования электроэнергии в транспортируемое топливо может быть востребована технология электрометанолиза в системах МЭЯ-АР.

Такие преимущества как одностадийность анаэробного процесса разложения органических веществ, потребление CO_2 , способность МЭЯ-АР работать при температуре окружающей среды и недорогие материалы позволяют считать электрометанолиз перспективной биотехнологией. В целом электрометанолиз все еще находится

на начальной стадии развития с точки зрения коммерческой готовности. Многие вопросы, такие как биохимические и электрофизические основы механизма ПМПЭ, микробиологические, касающиеся эффективного культивирования экзоэлектрогенов и электротрофов в биоэлектродных сообществах, а также технологические относительно быстрого запуска МЭЯ-АР и контроля за работой системы – еще недостаточно изучены. Для целей управляемого электрометанолиза необходимо более глубокое понимание процессов стимуляции электроактивных микроорганизмов и определение состава консорциумов микроорганизмов с учетом факторов, влияющих на метаболические пути получения нужных продуктов. Необходимо также изучение межвидовых взаимодействий микроорганизмов на основе определенных сокультур и исследование процессов формирования электроактивных биопленок в МЭЯ-АР. Основные проблемы при применении электрометанолиза включают недостаточное понимание взаимосвязей между компонентами системы и параметрами процесса, а также их сложные связи с анаэробным микробным сообществом и производительностью процесса. Будущие микробиологические и биотехнологические исследования наряду со всеобъемлющей экономической оценкой процесса должны сделать возможным использование электрометанолиза в МЭЯ-АР как биогазовой технологии следующего поколения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-25042.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nealson K.H.* // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. № 5. P. 1114–1119.
2. *Santoro C., Arbizzani C., Erable B., Ieropoulos I.* // *J. Power Sources.* 2017. V. 356. P. 225–244.
3. *Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. № 5. P. 307–319.
4. *Kadier A., Jain P., Lai B., Kalil M.S., Kondaveeti S., Alabbosh K.F.S., Abu-Reesh I.M., Mohanakrishna G.* // *Biofuel Res. J.* 2020. V. 25. P. 1128–1142.
5. *Lovley D.R.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 391–409.
6. *Barua S., Dhar B.R.* // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 244. P. 698–707.
7. *Lovley D.R.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2017. V. 71. P. 643–664.
8. *Doyle L. E., Marsili E.* // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 258. P. 354–364.
9. *Schievano A., Pepé Sciarria T., Vanbroekhoven K., De Wever H., Puig S., Andersen S.J., Rabaey K., Pant D.* // *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34. № 11. P. 866–878.

10. Baek G., Kim J., Kim J., Lee C. // *Energies*. 2018. V. 11. Article № 107. <https://doi.org/10.3390/en11010107>
11. Martins G., Salvador A.F., Pereira L., Alves M. // *Environ. Sci. Technol.* 2018. V. 52. № 18. P. 10241–10253.
12. Zhao Z., Li Y., Zhang Y., Lovley D. // *iScience*. 2020. V. 23. Article № 10179. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101794>
13. Ножевникова А.Н., Русскова Ю.И., Луттму Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А. // *Микробиология*. 2020. Т. 89. № 2. С. 131–151.
14. Blasco-Gomez R., Baille-Vilanova P., Villano M., Dolores Balaguer M., Colprim J., Puig S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. Article № 874. <https://doi.org/10.3390/ijms18040874>
15. Mostafa A., Im S., Song Y.-C., Ahn Y., Kim D.-H. // *Processes*. 2020. V. 8. Article № 424. <https://doi.org/10.3390/pr8040424>
16. Zakaria B. S., Lin L., Chung T., Dhar B. R. // *Adv. Bioenergy*. 2020. V. 5. P. 129–167. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2020.04.004>
17. Clauwaert P., Verstraete W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 82. P. 829–836.
18. Yu Z., Leng X., Zhao S., Ji J., Zhou T., Khan A., Kakde A., Liu P., Li X. // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 255. P. 340–348.
19. Zakaria B.S., Dhar B.R. // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 289. Article № 121738. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121738>
20. Huang Q., Liu Y., Dhar B.R. // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2020. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1813065>
21. Zhang Y., Angelidaki I. // *Water Res.* 2014. V. 56. P. 11–25.
22. Logan B.E., Call D., Cheng S., Hamelers H.V.M., Sleutels T.H.J.A., Jeremiassen A.W., Rozendal R.A. // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 23. P. 8630–8640.
23. Казаринов И.А., Мецержакова М.О., Карамышева Л.В. // *Электрохимическая энергетика*. 2016. Т. 16. № 4. С. 207–225.
24. Rozendal R.A., Hamelers H.V., Rabaey K., Keller J., Buisman C.J. // *Trends Biotechnol.* 2008. V. 26. № 8. P. 450–459.
25. Дебабов В.Г. // *Микробиология*. 2008. Т. 77. № 2. С. 149–157.
26. Дебабов В.Г. // *Биотехнология*. 2017. Т. 33. № 3. С. 9–28.
27. Rousseau R., Etcheverry L., Roubaud E., Basséguy R., Délia M.-L., Bergel A. // *Applied Energy*. 2020. V. 257. Article № 113938. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113938>
28. Park D.H., Laivenieks M., Guettler M.V., Jain M.K., Zeikus J.G. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 7. P. 2912–2917.
29. Cheng S., Xing D., Call D.F., Logan B.E. // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43. № 10. 3953–3958.
30. Choi O., Sang B.I. // *Biotechnol. Biofuels*. 2016. V. 9. № 1. Article № 11.
31. Geppert F., Liu D., van Eerten-Jansen M., Weidner E., Buisman C., Ter Heijne A. // *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34. № 11. P. 879–894.
32. Bo T., Zhu X., Zhang L., Tao Y., He X., Li D., Yan Z. // *Electrochem. Commun.* 2014. V. 45. P. 67–70.
33. Escapa A., Mateos R., Martinez E.J., Blanes J. // *Renew Sustain. Energy Rev.* 2016. V. 55. P. 942–956.
34. Park S.G., Rhee C., Shin S.G., Shin J., Mohamed H.O., Choi Y.J., Chae K.J. // *Environ. Int.* 2019. V. 131. Article № 105006. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105006>
35. Луттму Ю.В., Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Русскова Ю.И., Ножевникова А.Н. // *Актуальная биотехнология*. 2019. № 3. С. 450–455.
36. Moscoviz R., Toledo-Alarcon J., Trably E., Bernet N. // *Trends Biotechnol.* 2016. V. 34. № 11. P. 856–865.
37. Cai W., Liu W., Zhang Z., Feng K., Ren G., Pu C., Li J., Deng Y., Wang A. // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 661. P. 178–186.
38. Chen Yu. B., Yin C., Zhang C., Dai X., Yuan H., Zhu N. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 1581–1588.
39. Lee B., Park J.G., Shin W.-B., Tian D.J., Jun H.B. // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 234. P. 273–280.
40. Xafenias N., Mapelli V. // *Int. J. Hydrog. Energy*. 2014. V. 39. № 36. P. 21864–21875.
41. Luo L., Xu S., Jin Y., Han R., Liu H., Lü F. // *Environ. Technol.* 2018. V. 39. № 6. P. 739–748.
42. Park J.-G., Lee B., Park H.-R., Jun H.-B. // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 273. P. 478–486.
43. Sasaki K., Sasaki D., Tsuge Y., Morita M., Kondo A. // *Biotechnol. Biofuels*. 2018. V. 11. № 1. Article № 173.
44. Cai W., Liu W., Zhang Z., Feng K., Ren G., Pu C., Sun H., Li J., Deng Y., Wang A. // *Water Res.* 2018. V. 136. P. 192–199.
45. Wang L., Yang C., Sangeetha T., He Z., Guo Z., Gao L., Wang A., Liu W. // *Bioresour. Technol.* 2020. V. 313. Article № 123657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123657>
46. Enzmann F., Mayer F., Rother M., Holtmann D. // *AMB Expr.* 2018. V. 8. Article № 1. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0531-x>
47. Venkiteshwaran K., Bocher B., Maki J., Zitomer D. // *Microbiol. Insights*. 2016. V. 8. № 2. P. 37–44.
48. Zhao Z., Zhang Y., Chen S., Quan X., Yu Q. // *Scientific Reports*. 2014. V. 4. 6658. <https://doi.org/10.1038/srep06658>
49. Saheb-Alam S., Persson F., Wilén B.M., Hermansson M., Modin O. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. 2356. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38006-3>
50. Fu Q., Kuramochi Y., Fukushima N., Maeda H., Sato K., Kobayashi H. // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. № 2. P. 1225–1232.
51. Xu S., Zhang Y., Luo L., Li H. // *Bioresource Technology Reports*. 2019. V. 5. P. 91–98.
52. LaBarge N., Yilmazel Y.D., Hong P.-Y., Logan B.E. // *Bioelectrochemistry*. 2017. V. 113. P. 20–25.

53. Siegert M., Yates M.D., Spormann A.M., Logan B.E. // ACS Sustain. Chem. Eng. 2015. V. 3. № 7. P. 1668–1676.
54. Speers A.M., Young J.M., Reguera G. // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. № 11. P. 6350–6358.
55. Yan W., CBЭн N., Xiao Y., Chen Y., Sun F., Tyagi V.K., Zhou Y. // Bioresour. Technol. 2017. V. 239. P. 336–344.
56. Li Y., Zhang Y., Liu Y., Zhao Z., Zhao Z., Liu S., Zhao H., Quan X. // Bioresour. Technol. 2016. V. 218. P. 505–511.
57. Dhar B.R., Park J.-H., Park H.-D., Lee H.-S. // Chem. Engin. J. 2019. V. 359. P. 208–216.
58. Sun R., Zhou A., Jia J., Liang Q., Liu Q., Xing D., Ren Z. // Bioresour. Technol. 2015. V. 175. P. 68–74.
59. Perona-Vico E., Blasco-Gómez R., Colprim J., Puig S., Bañeras L. // PLoS One. 2019. V.14. № 4. e0215029. . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215029>
60. Sikora A., Detman A., Chojnacka A., Blaszczyk M.K. // in the book: Fermentation Processes. INTECH. 2017. Ch. 14. P. 271–301. <https://doi.org/10.5772/64645>
61. Li Y., Chen Y., Wu J. // Applied Energy. 2019. V. 240. P. 120–137.
62. Litti Yu., Kovalev D., Kovalev A., Katraeva I., Russkova J., Nozhevnikova A. // J. Phys: Conf. Series. 2018. V. 1111. Article № 012013.
63. Лутти Ю. В., Ковалев Д. А., Ковалев А. А., Катраева И. В., Михеева Э. Р., Пожевникова А. Н. // Водоснабжение и санитарная техника. 2019. № 11. С. 32–40.
64. Mikheeva E.R., Katraeva I.V., Vorozhtsov D.L., Litti Yu.V., Nozhevnikova A.N. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 736–742.
65. Kovalev A.A., Kovalev D.A., Litti Yu.V., Katraeva I.V. // J. Phys.: Conf. Ser. 2020. V. 1652. Article № 012014.
66. Guo X., Liu J., Xiao B. // International J. Hydrogen Energy. 2013. V. 38. № 3. P. 1342–1347.
67. Choi K., Kondaveeti S., Min B. // Bioresour. Technol. 2017. V. 245. P. 826–832.
68. Ding A., Yang Y., Sun G., Wu D. // Chem. Eng. J. 2016. V. 283. P. 260–265.
69. Sun M., Zhang Z., Lv M., Liu G., Feng Y. // Bioresour. Technol. 2020. V. 315. Article № 123764. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123764>
70. Feng Y., Zhang Y., Chen S., Quan X. // Chem. Eng. J. 2015. V. 259. P. 787–794.
71. Cai W., Liu W., Yang C., Wang L., Liang B., Thangavel S., Guo Z., Wang A. // ACS Sustain. Chem. Eng. 2016. V. 4. P. 4913–4921.
72. Park J.-G., Lee B., Shi P., Kim Y., Jun H.-B. // Int. J. Hydrogen Energy. 2017. V. 42. P. 27732–27740.
73. Feng Q., Song Y.C., Ahn Y. // Bioresour. Technol. 2018. V. 259. P. 119–127.
74. Liu W., Cai W., Guo Z., Wang L., Yang C., Varrone C., Wang A. // [REMOVED HYPERLINK FIELD]Renew. Energy. 2016. V. 91. P. 334–339.
75. Xiao B., Chen, X., Han Y., Liu J., Guo X. // Renew. Energy. 2018. V. 115. P. 1177–1183.
76. Dou Z., Dykstra C.M., Pavlostathis S.G. // Sci. Total Environ. 2018. V. 633. P. 1012–1021.
77. Kovalev A.A., Kovalev D.A., Zhuravleva E.A., Katraeva I.V., Panchenko V., Fiore U., Litti Y.V. // Renew. Energy. 2022. V. 181. P. 966–977.
78. Harb M., Ermer N., Bou C., Sawayaa N., Smith A.L. // Environ. Sci.: Water Res. Technol. 2020. V. 6. P.737–746.
79. Hussain S.A., Perrier M., Tartakovsky B. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. V. 41. № 4. P. 543–553.
80. Chen H., Simoska O., Lim K., Grattieri M., Yuan M., Dong F., Lee Y.S., Beaver K. // Chem. Rev. 2020. V. 120. № 23. P. 12903–12993.
81. Noori M. T., Vu M. T., Ali R. B., Min B. // Chem. Eng. J. 2020. V. 392. Article № 123689. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123689>
82. Cruz Viggì C., Colantoni S., Falzetti F., Bacaloni A., Montecchio D., Aulenta F. // Fuel Cells. 2020. V. 20. № 1. P. 98–106.
83. Luo S., Fu B., Liu F., He K., Yang H., Ma J., Wang H., Zhang X., Liang P., Huang X. // Water Res. 2020. V. 172. Article № 115493. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115493>
84. Sangeetha T, Guo Z, Liu W, Gao L, Wang L, Cui M. Chuan C., Aijie W. // Appl. Energy. 2017. V. 206. P. 1214–1224.
85. Feng Q., Song Y., Kim D., Kim M., Kim D. // Int. J. Hydrog. Energy. 2018. V. 44. № 4. P. 2170–2179.
86. Guo K., PrévotEAU A., Patil S., Rabaey K. // Curr. Opin. Biotechnol. 2015. V. 33. P. 149–156.
87. Grady C.P.L., Daigger G.T., Love N.G., Filipe C.D.M. // Biological Wastewater Treatment (3 Ed.). /Ed. Taylor and Francis Group, Boca Raton, CRC Press, 2011.
88. Ahn Y., Im S., Chung J.W. // Int. J. Hydrog. Energy. 2017. V. 42. P. 27784–27791.
89. Tian T., Qiao S., Yu C., Yang Y., Zhou J. // Chemosphere. 2019. V. 218. P. 119–127.
90. Liu D., Zhang L., Chen S., Buisman C., Heijne A. // Water Res. 2016. V. 99. P. 281–287.
91. Park J., Lee B., Tian D., Jun H. // Bioresour. Technol. 2018. V. 247. P. 226–233.
92. Liu X., Chen Q., Sun D., Wang Y., Dong H., Dang Y., Holmes D.E. // Bioresour. Technol. 2019. V. 297. Article № 122422. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122422>
93. Katuri K.P., Ali M., Saikaly P.E. // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 57. P. 101–110.
94. Baek G., Kim J., Kim J., Lee C. // Bioresour. Technol. 2019. V. 297. Article № 122443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122443>
95. Baek G., Saikaly P.E., Logan B.E. // Wat. Res. 2021. V. 188. Article № 116575. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116575>

Electromethanogenesis is a Perspective Biotechnology of Anaerobic Treatment of Organic Waste

Yu. V. Litti^{a, *}, Yu. I. Russkova^a, E. A. Zhuravleva^a, S. N. Parshina^a,
A. A. Kovalev^b, D. A. Kovalev^b, and A. N. Nozhevnikova^a

^a *S.N. Winogradsky Institute of Microbiology, the Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”, Moscow, 119071 Russia*

^b *Federal Scientific Agroengineering Centre VIM”, Moscow, 109428 Russia*

**e-mail: litty-yuriy@mail.ru*

The ability of microorganisms to carry out interspecies electron transfer in the process of degradation of organic substances under anaerobic conditions, opens up new possibilities for a controlled increase in the efficiency of methanogenic decomposition of organic waste. This review presents the main principles of the effects of a direct electric current on the anaerobic degradation of organic substances, process parameters, changes in the composition of the microbial community and factors affecting the optimization of the hybrid systems comprising microbial electrolysis cell (MEC) and anaerobic digester (AD), i.e. MEC-AD system performance. An analysis of research in this field has been carried out for the subsequent application of electromethanogenesis representing a new energy-efficient biotechnology for anaerobic wastewater treatment and organic waste digestion.

Keywords: anaerobic digestion, microbial electrolysis cell (MEC), anaerobic digester (AD), MEC-AD system, electroactive microorganisms, electromethanogenesis

УДК 547.963.4:633.35

ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОГЛОБИНА КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ (*Vicia faba* L.) ПО ОТНОШЕНИЮ К ГИДРОПЕРОКСИДУ *трет*-БУТИЛА

© 2022 г. О. В. Космачевская¹, Э. И. Насыбуллина¹, А. Ф. Топунов¹, *

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

*e-mail: aftorunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.07.2021 г.

После доработки 30.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Легоглобин (**Lb**) – гемоглобин клубеньков бобовых растений, как и многие другие гемоглобины, проявляет пероксидазную активность и может окислять различные вещества с участием H_2O_2 или органических перекисей. Исследована пероксидазная активность Lb, выделенного из клубеньков бобов (*Vicia faba* L.), в реакции с гидропероксидом *трет*-бутила – аналогом органических гидроперекисей, и *о*-дианизидином в качестве восстанавливающего субстрата. Реакция, катализируемая Lb, описывалась классическим уравнением Михаэлиса-Ментен ($V_{max} = 1.3$ моль/мин · mM гема, $K_m = 0.8$ mM). Определены концентрации субстратов, не лимитирующие скорость пероксидазной реакции, – 0.8 mM для *о*-дианизидина и 1 mM для гидропероксида *трет*-бутила. При снижении pH с 9.0 до 6.0 пероксидазная активность Lb увеличивалась почти в 2 раза, что может иметь значение для клубеньков *in vivo*, например, при их старении, когда снижается pH и увеличивается содержание окисленного Lb. Несмотря на то, что по пероксидазной активности Lb уступает истинным пероксидазам, он может обеспечить дополнительную антиоксидантную защиту при окислительном стрессе, учитывая его высокую концентрацию в клубеньке.

Ключевые слова: легоглобин, гемоглобин, миоглобин, пероксидаза корней хрена, псевдопероксидазная активность, пероксид *трет*-бутила

DOI: 10.31857/S0555109922010044

Легоглобин (**Lb**) – кислородпереносающий гемопротеид клубеньков бобовых растений, в которых он поддерживает кислородные условия на уровне, оптимальном для процесса азотфиксации. Lb содержится в цитоплазме инфицированной клетки в очень высокой концентрации: $1-5 \times 10^{-4}$ M [1] и обеспечивает градиент концентрации O_2 от десятков мкМ у плазмалеммы до нескольких нМ в центральной части клетки (у мембраны бактериоида) [2, 3]. Легоглобин – мономерный белок с молекулярной массой ~16.5 кДа, содержащий гем (протопорфирин IX). Lb структурно и функционально подобен миоглобину (**Mb**) и эритроцитарному гемоглобину (**Hb**), поскольку все эти белки происходят от общего предка [4, 5].

Кроме связывания и транспорта молекулярного кислорода и оксида азота (NO), многие гемоглобины способны проявлять различные каталитические активности, среди которых и пероксидазная [6, 7]. По своим каталитическим свойствам гемоглобины, как правило, уступают “классическим” ферментам и не всегда очевидна биологическая целесообразность этих свойств. По этой причине

гемоглобины относят к так называемым ферментомиметикам.

Серьезные исследования взаимодействия Hb и Mb с H_2O_2 начались в 1950 гг. [8, 9]. Позже было показано, что и другие гемоглобины способны проявлять пероксидазную активность. Hb полихеты *Amphitrite* с помощью H_2O_2 окисляет галофенолы до менее токсичных хинонов [10], а флавогемоглобин *E. coli* восстанавливает алкилгидропероксида до спиртов [11]. Пероксидазной активностью также обладают нейроглобины и цитоглобины [12]. Интерес к пероксидазной активности гемоглобинов обусловлен еще и тем, что они представляют собой удобную для кинетических исследований модель, поскольку с H_2O_2 реагируют значительно медленнее, чем истинные пероксидазы и каталазы.

Поскольку константа скорости пероксидазной реакции, катализируемой гемоглобинами, намного ниже констант скоростей истинных пероксидаз, то обычно применяют термин “псевдопероксидазная активность”, тем самым подчеркивая второстепенность этой функции для белков – переносчиков кислорода [6, 13–15].

Еще в конце 1970-х гг. было показано, что Lb может катализировать окисление электрон-донорных субстратов перекисью водорода [16, 17]. Также известно, что Lb в качестве окисляющего субстрата может использовать этил-гидропероксид [16]. Поскольку Lb образует гемовые комплексы с алифатическими кислотами [18], не исключена возможность взаимодействия его с небольшими алкилгидропероксидами, такими, как гидропероксид *трет*-бутила (*t*-ВООН). Интерес к алкилгидропероксидам, как к субстратам пероксидаз, вызван тем, что эти соединения образуются при окислительном стрессе и вызываемом им перекисном окислении липидов. Кроме того, они достаточно устойчивы и могут накапливаться в организме, в отличие от пероксида водорода.

Цель работы – исследование пероксидазной активности Lb по отношению к *t*-ВООН.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: фенилметилсульфонилфторид (PMSF) – производства “AppliChem” (Германия), пероксидаза из корня хрена тип RZ (HRP), морфолино-2-этансульфоновая кислота (МЭС), гидропероксид *трет*-бутила, *o*-дианизидин, пиридин, аскорбат натрия – “Sigma-Aldrich” (США), Servacel DEAE GS – “Serva” (Германия), ультрогель AcA 54 – “LKB” (Швеция), Трис – “ICN” (США). Остальные реактивы производства “Реахим” (Россия), квалификации “х. ч.” или “ос. ч.”.

Объект исследований и условия выращивания растений. Растения бобов (*Vicia faba* L.) сорта “Русские черные” (иногда употребляется название *Faba bona* Medik.) выращивали в полевых условиях Московской области (Россия). Растения инокулировали клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, производственный штамм CIAM 1026 из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия). Стерилизацию семян для всех опытов проводили розовым раствором перманганата калия в течении 30 мин с последующей промывкой водой. Доза инокулята составляла не менее 10^9 клеток на семя. Клубеньки собирали на стадии бутонизации – начала цветения, когда содержание Lb максимально.

Выделение и очистка Lb из клубеньков бобов. Клубеньки, отделенные от корней бобов, заливали холодным 0.1 М К–фосфатным буфером (pH 7.2), содержащим 0.2 М аскорбат натрия, 1%-ный высокомолекулярный поливинилпирролидон, 50 мкМ PMSF и 1 мМ MgCl₂. Соотношение клубеньков и буфера составляло 1 : 2 по массе. Затем клубеньки тщательно растирали в агатовой ступке, фильтровали через 2 слоя капронового полотна. Фильтрат центрифугировали с

охлаждением в течение 10 мин при 1000 g для удаления из экстракта загрязнений и крупных частиц растительной ткани. Lb-содержащую фракцию получали высаливанием белков супернатанта сульфатом аммония при насыщении 40–80%. Для поддержания pH 6.8–7.0 к супернатанту добавляли 10%-ный раствор аммиака.

Осадок, содержащий Lb, растворяли в минимальном количестве 0.02 М К-фосфатного буфера pH 7.2, центрифугировали при 23000 g в течении 20 мин, после чего супернатант наносили на колонку (60 × 1.0 см) с носителем Ultrogel AcA-54 (“LKB”, Швеция), уравновешенным 0.02 М К–фосфатным буфером (pH 7.2). Выход фракций с колонки регистрировали спектрофотометрически при 280 нм. Последующую очистку Lb проводили на анионообменнике Servacel DEAE GS (7 × 2 см), уравновешенном 0.01 М К-фосфатным буфером (pH 7.2). Фракционирование Lb проводили элюцией линейным градиентом NaCl от 0 до 1.0 М в 0.01 М К-фосфатном буфере (pH 7.2). Фракция Lb выходила с колонки в диапазоне 0.2–0.4 М NaCl. Элюат, полученный с колонки Servacel DEAE GS, окисляли раствором феррицианида калия для перевода Lb в окисленную мет-форму (*metLb*) и диализовали в 0.02 М К-фосфатном буфере (pH 7.2). Белок концентрировали на мембране Millipore (Merk, Германия) в ячейке для ультрамембранного концентрирования под током аргона. Lb, выделенный из клубеньков бобов, представлял собой сумму его компонентов (изоформ). Все процедуры по очистке Lb проводили на холоду (5°C).

Определение количества гемов. Для определения концентрации гемовых групп получали пиридингемохромоген по методу [19]. К 150 мкл раствора белка добавляли 450 мкл раствора пиридина (пиридин в 0.1 н растворе NaOH в соотношении 1 : 3), после перемешивания общий объем разделяли на две части, в одной из которых пиридингемохромоген восстанавливали дитионитом натрия, а в другой – окисляли феррицианидом калия. После этого измеряли оптическое поглощение восстановленного пиридингемохромогена против окисленного при 556 и 539 нм. Определяли разницу $\Delta D = (D_{556\text{red}} - D_{556\text{oxi}}) - (D_{539\text{red}} - D_{539\text{oxi}})$ и рассчитывали концентрацию гемовых групп, используя значение коэффициента миллимолярной экстинкции $\Delta E = 4.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, определенное нами для данного ΔD [20]. В качестве стандартного белка использовали Mb.

Определение пероксидазной активности. Пероксидазную активность гемопротеидов измеряли с использованием в качестве донора электронов *o*-дианизидина по методу [21] с модификациями. Продукт окисления *o*-дианизидина определяли при длине волны 454 нм ($\epsilon_{454} = 30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Состав реакционной смеси: 0.1 М К-фосфатный бу-

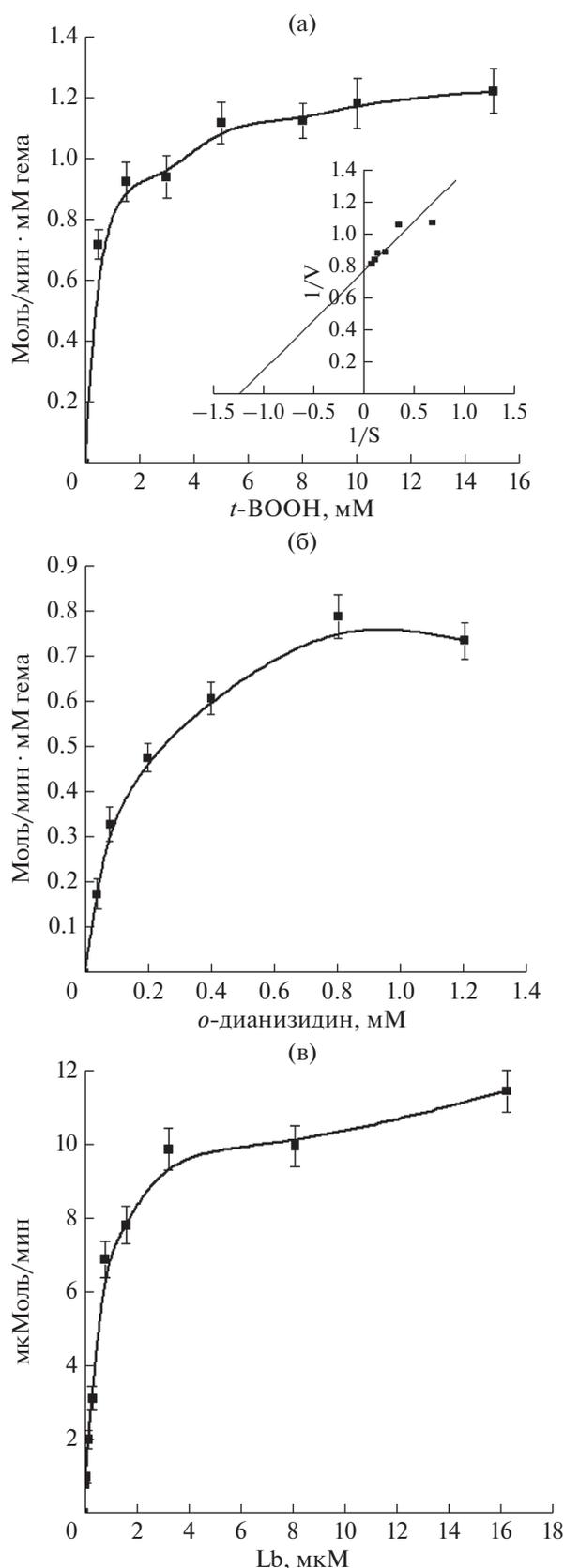


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей пероксидазной реакции, катализируемой Lb клубеньков бобов, от концентрации *t*-BOOH (а), от концентрации *o*-дианизида (б), от концентрации Lb (в).

фер (рН 7.5), 0.8 мМ *o*-дианизидин, 8 мкМ гемопротеид, 0.5 мМ *t*-BOOH. Измерения проводили при температуре 25°C на спектрофотометре “Cary” (“VarianBio”, США).

При определении рН-зависимости пероксидазной активности Lb, измерения проводили в различных буферных системах, оптимальных для поддержания рН в разных диапазонах: МЭС (рН 6.0), К-фосфатный буфер (рН 6.8 и 7.5), карбонатный буфер (рН 8.5 и 9.0).

Все эксперименты были выполнены не менее, чем в трех повторностях. На графиках представлены средние величины. Статистическая обработка данных проводилась исходя из 3–4 аналитических повторностей в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пероксидазная активность Lb в зависимости от концентрации субстратов. Пероксидазную активность выделенного Lb определяли с использованием *t*-BOOH и *o*-дианизида в качестве восстанавливающего субстрата.

Исследование пероксидазных свойств Lb проводили в сравнении с пероксидазой корня хрена (HRP) — наиболее изученной и широко используемой в биохимии истинной гемсодержащей пероксидазой [22]. В качестве восстанавливающего субстрата был применен искусственный донор электронов *o*-дианизидин, который ранее был использован в качестве субстрата для выявления пероксидазной активности Hb в плазме крови в совместной работе с Институтом физико-химической медицины (Москва, Россия), Белорусским государственным университетом и Научно-практическим центром “Кардиология” (Минск, Республика Беларусь) [14].

Были проведены измерения начальной скорости реакции для ряда концентраций *t*-BOOH (рис. 1а). Кинетическая схема реакции описывается классическим уравнением Михаэлиса-Ментен. Для определения константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V_{max}) данные были представлены в координатах Лайнуивера-Берка (пример показан на врезке рис. 1а). Были рассчитаны максимальная скорость реакции, константа Михаэлиса и субстратная константа (K_s), характеризующая взаимодействие фермента с субстратом в равновесных условиях (табл. 1). Показано, что зависимость начальной скорости реакции от концентрации восстановителя — *o*-дианизида (рис. 1б) соответствует классической кинетике Михаэлиса. Была измерена зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента (рис. 1в). При концентрации Lb 3.0 мМ скорость пероксидазной реакции достигала максимального значения и выходила на плато.

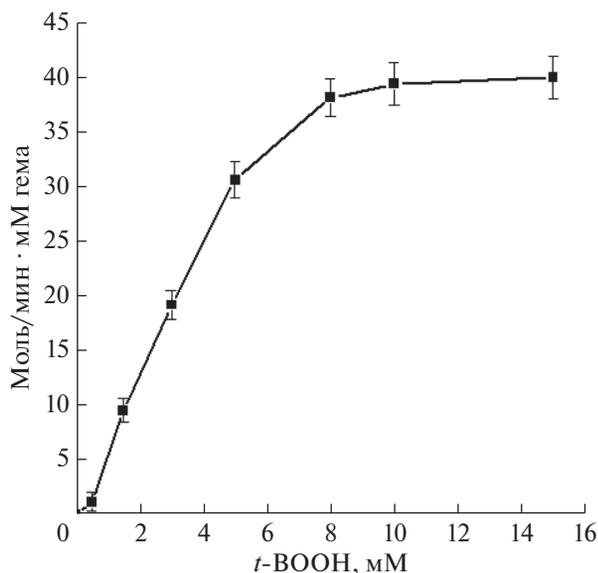


Рис. 2. Зависимость начальной скорости пероксидазной реакции, катализируемой пероксидазой корней хрена, от концентрации *t*-BOOH.

Анализ результатов, представленных на рис. 1, позволил выбрать концентрации *t*-BOOH и *o*-данизида, не лимитирующие скорость реакции, — 1.0 mM и 0.8 mM соответственно.

Сравнение пероксидазной активности Lb и пероксидазы хрена. В аналогичных условиях (см. Методика) была изучена способность пероксидазы корней хрена взаимодействовать с *t*-BOOH. Реакция, катализируемая HRP, как и в случае Lb, соответствует классической кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 2). HRP — истинная пероксидаза была использована для сравнения с Lb, который является псевдопероксидазой. Для HRP были определены параметры реакции (табл. 1). Максимальная скорость реакции, катализируемой HRP, в 57 раз превышала V_{max} для Lb (табл. 1). Константа Михаэлиса HRP в 10.8 раза превосходила такую для Lb.

Несмотря на то, что HRP была гораздо более активным катализатором разложения *t*-BOOH, структурные особенности этого фермента не благоприятствуют его взаимодействию с алифатиче-

Таблица 1. Кинетические параметры пероксидазной реакции с участием леоглобина клубеньков бобов и пероксидазы корней хрена

Параметр	Lb	HRP
V_{max} , М/мин · mM гема	1.3	70.5
K_m , mM	0.8	8.7
K_s , mM	0.4	8.0

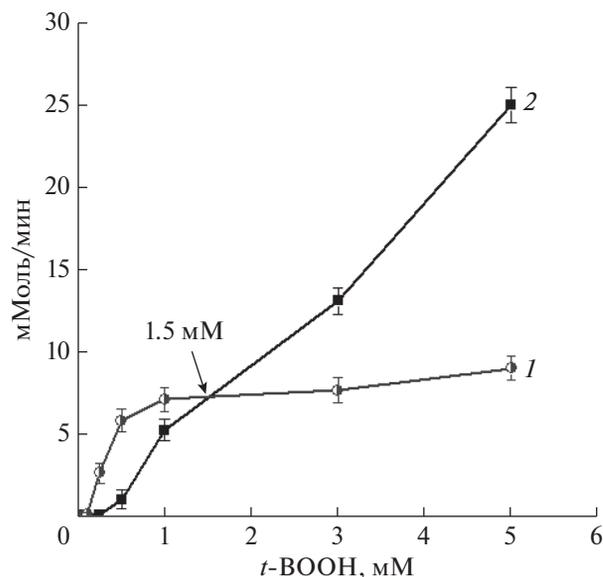


Рис. 3. Зависимость начальной скорости пероксидазной реакции, катализируемой суммарным препаратом Lb клубеньков бобов и пероксидазой корней хрена, от концентрации *t*-BOOH. 1 — Lb, 2 — HRP.

скими гидропероксидами, поскольку гем в этом ферменте расположен в узкой полости, что исключает возможность проникновения даже относительно небольших молекул [22]. Напротив, в структуре леоглобинов заложена способность к связыванию крупных лигандов [18, 23, 24]. Кроме того, проявлению пероксидазных свойств Lb также способствуют гидрофобное окружение гема, конформационная лабильность имидазольного кольца дистального гистидина и порфирина, а также наличие аргинина и аспарагина в дистальной области гемового кармана. Можно предположить, что функционально Lb занимает промежуточное положение между другими гемоглобинами и пероксидазами. Действительно, пероксидазная активность Lb на порядок выше, чем у Mb, но на несколько порядков ниже, чем у истинных пероксидаз [16].

Можно предположить, что несмотря на низкие скорости реакции, Lb все же способен вносить заметный вклад в элиминацию пероксидов за счет своего высокого содержания в инфицированных клетках клубенька — 0.1–0.5 mM, а в очень активных клубеньках — до 2–3 mM [1, 25]. Проведено сравнение зависимости начальных скоростей реакций от концентраций *t*-BOOH, катализируемых Lb и HRP, взятых в разных концентрациях: 8 мкM Lb и 0.8 мкM HRP (рис. 3). Анализ представленных на рис. 3 кривых показал, что при низких концентрациях *t*-BOOH (≤ 1.5 mM) Lb по своей пероксидазной активности даже несколько превосходил HRP. Возможно, это связано с большей способностью гемового кармана Lb взаимодействовать с крупными соединениями.

Однако в отличие от истинных пероксидаз, большие концентрации пероксидов вызывают окислительное повреждение белка, вследствие чего снижается его каталитическая активность.

рН-зависимость пероксидазной активности Lb.

Известно, что пероксидазные свойства гемоглобинов зависят от рН раствора [6, 26, 27], поэтому было проверено, как меняется пероксидазная активность Lb в диапазоне рН от 6.0 до 9.0. При снижении рН с 9.0 до 6.0 пероксидазная активность Lb увеличивалась почти в 2 раза (на 85%) (рис. 4). Как известно, рН внутри клубенька находится в диапазоне 6.4–6.8, и только при старении снижается до 6.0 [28], поэтому изменение пероксидазной активности Lb в физиологическом диапазоне рН будет незначительным (~6%). Эти результаты хорошо соотносятся с данными по Mb, пероксидазная активность которого увеличивается при физиологическом снижении рН с 7.4 до 6.1 [27].

Зависимость разложения пероксидов от рН объясняется тем, что при низком значении рН оксоферрильный интермедиат (порфирин–Fe^{IV}=O) протонируется с образованием интермедиата феррилгидроксила (порфирин–Fe^{IV}–ОН[−]) со значением рК = 3.5 (реакция 1) [6, 26]. Из-за нестабильности феррилгидроксила электронно

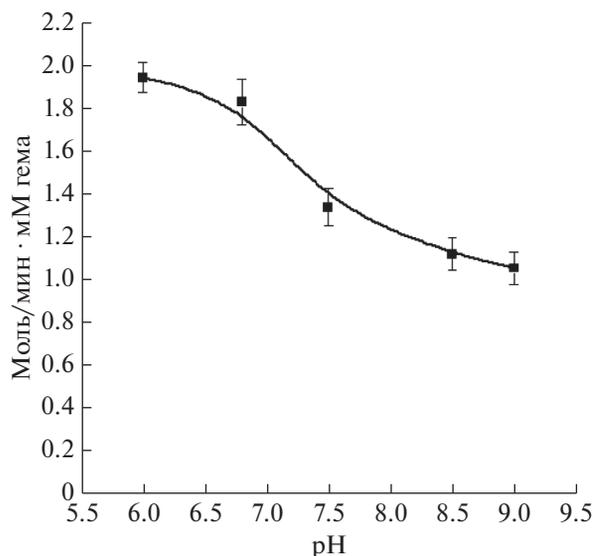
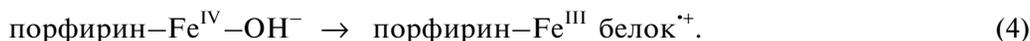
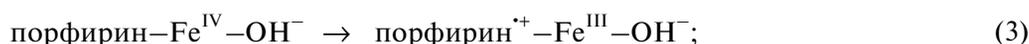
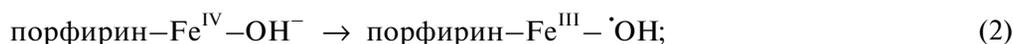


Рис. 4. рН-зависимость начальной скорости пероксидазной реакции, катализируемой Lb.

эквивалентен трехвалентному гему и радикалу на гидроксильном лиганде (реакция 2), порфирине (реакция 3) или белке (реакция 4):



Самовосстановление протонированной формы феррила происходит за счет отрыва электрона от порфиринового кольца, белка или другого субстрата. Эта форма обеспечивает быструю регенерацию белка до метформы (порфирин–Fe^{III}), что и объясняет увеличение активности пероксидазы гемопротеидов при кислых значениях рН [6].

Кислая среда способствует не только элиминации перекисей, но и перекисному окислению ненасыщенных жирных кислот [29, 30], в результате которого образуются алкоксильные (RO[•]) и алкилпероксильные (ROO[•]) радикалы и гидроперекиси липидов (LOOH) [15, 26].



Аналогичные данные были получены и для Mb, который является структурным аналогом Lb. В случае Mb повышенное перекисное окисление липидов наблюдалось при рН 5.0–5.5 [29]. Эти реакции миоглобина имеют последствия при патологических процессах, сопровождающихся ацидозом: воспалении, ишемии/реперфузии миокарда и острой почечной недостаточности.

Возможные механизмы пероксидазной активности гемоглобинов. Пероксидазы (КФ 1.11.1.X) катализируют окисление широкого спектра субстратов под действием пероксида водорода и других пероксидов [22]. Их можно разделить на две группы: 1) ферменты, которые по своей природе являются пероксидазами (истинные пероксидазы), и 2) ферменты, которые превращаются в пе-

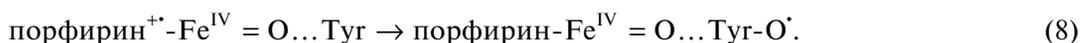
роксидазы в результате активации (псевдопероксидазы) [31].

Истинные пероксидазы устроены так, чтобы белковая часть не подвергалась повреждению оксоферрильными интермедиатами, являющимися окислителями субстратов. Наиболее яркая особенность таких пероксидаз – наличие ковалентных связей между гемом и белком, предотвращающих его деградацию, высвобождение и участие в неконтролируемых редокс-превращениях [32–34]. Кроме того, истинные пероксидазы не содержат окисляемых аминокислот в непосредственной близости от гема. Ковалентные связи между гемом и белком могут быть результатом действия специальных сшивающих ферментов или автокаталитического созревания. Например, сложноэфирные связи в пероксидазах млекопитающих – это результат автокаталитического созревания [35].

Каталитический цикл гем-содержащих пероксидаз начинается с быстрого взаимодействия фермента и H_2O_2 с образованием Соединения I (порфирин⁺⁺-[Fe^{IV}=O]), которое содержит 2

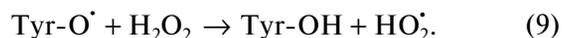
окислительных эквивалента: оксоферрил-гем и свободный радикал, локализованный в π -системе гема. Соединение I восстанавливается донором электронов, что приводит к образованию Соединения II, а затем нативного фермента [26, 36].

Взаимодействие Hb с H_2O_2 или органическими пероксидами также приводит к двухэлектронному окислению белка с образованием феррильного интермедиата (порфирин-Fe^{IV}=O) с катион радикалом на порфириновом кольце, аналогичного Соединению II истинных пероксидаз [15, 26]. Однако в отличие от пероксидаз, этот радикал мигрирует на аминокислоту (тирозин, триптофан, гистидин, цистеин), расположенную вблизи гемового кармана [15, 26]. В Lb обычно образуется феноксильный радикал тирозина [17, 18, 37]. Эти белковые радикалы участвуют в образовании межмолекулярных и внутримолекулярных сшивок гем-белок [18, 37, 38], поэтому участие Lb в пероксидазном каталитическом цикле, как правило, сопровождается окислительной инактивацией белка [17]:

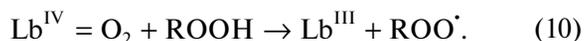


Легоглобины сои, гороха, фасоли, бобов содержат три остатка тирозина в позициях 25, 30 и 132 (133 у соевого Lb). Lb люпина содержит только один остаток тирозина в позиции 132, Тур-30 заменен на фенилаланин [39]. Тур-30 контактирует с гемом, а Тур-25 с крупными заряженными лигандами в шестом координационном положении гема. Остаток Тур-132 взаимодействует с винильной группой пиррольного кольца. На Тур-132, вероятнее всего, и образуется феноксильный радикал. Радикал может локализоваться и на остатке Тур-30, который также контактирует с гемом и, следовательно, с кислородом оксоферрильного интермедиата Lb-Fe^{IV}=O [18]. У Mb и Hb, как правило, свободный радикал также локализуется на остатке тирозина [40].

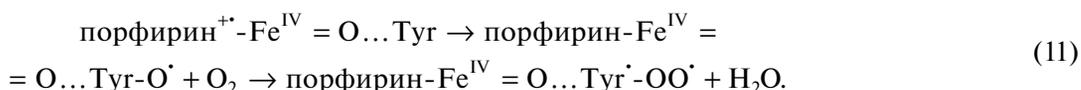
Феноксильный радикал тирозина может взаимодействовать с другой молекулой гидропероксида водорода:



В условиях высокой концентрации органических пероксидов они могут выступать в роли восстановителей оксоферрильной формы Lb, что сопровождается образованием пероксильных радикалов, которые усиливают окислительные повреждения:



Пероксильные радикалы могут образовываться на аминокислотных остатках самого белка, чаще всего на остатках триптофана, тирозина и цистеина, когда молекулярный кислород реагирует с радикалом аминокислоты [26]:



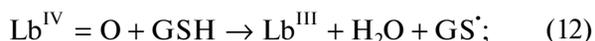
Радикалы аминокислот могут окислять другие молекулы: или субстраты, или сам белок. В первом случае окисляются крупные молекулы, которые не имеют доступа к гемовому карману [26, 41], во втором – происходит межмолекулярный пере-

нос электронов, сопровождающийся образованием белковых олигомеров.

Феррилформы Hb, Mb и Lb и радикалы, образовавшиеся на остатках аминокислот в белке,

индуцируют реакции свободнорадикального окисления липидов мембран. Под действием образующихся при этом алкоксильных ($RO\cdot$) и алкилпероксильных ($ROO\cdot$) радикалов и гидропероксидов липидов ($LOOH$) [15, 26] происходит окислительная модификация Hb, приводящая к деградации гема и высвобождению ионов железа. Ионы железа катализируют образование свободных радикалов в реакциях Фентона и Хабера–Вайса [42]. Именно это отличает пероксидазы-гемоглобины от истинных пероксидаз, окислительная активность которых направлена на определенные субстраты. То же самое, скорее всего, происходит и с окисленными интермедиатами Lb.

Lb может функционировать в пероксидажном каталитическом цикле только при наличии веществ, восстанавливающих феррильный интермедиат до metLb. Одним из эффективных восстановителей $Lb-Fe^{IV}=O$ является глутатион (**GSH**), присутствующий в больших концентрациях в растительных клетках клубеньков бобовых [43]. В результате этой реакции образуется окисленный дисульфид GSSG и тиольный радикал ($GS\cdot$) согласно реакциям:



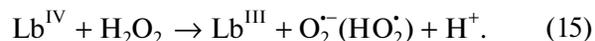
Другими физиологическими восстановителями ferrylLb могут быть НАДН, НАДФН, флавины, аскорбат и липоевая кислота [27, 44, 45], поэтому наличие достаточных количеств восстанавливающих субстратов может предотвратить как инактивацию Lb, так и перекисное окисление липидов.

Для Hb обсуждается еще один способ быстрого превращения оксоферрильного интермедиата в метформу – реакция конпропорционирования, когда окислителем и восстановителем является один и тот же химический элемент в разных степенях окисления [46]:



Эта реакция происходит за счет межмолекулярного переноса электронов между остатками тирозина молекул Hb [46].

В отличие от оксоферрилгемоглобина, феррилгемоглобин (гем- Fe^{IV}) вызывает не двух-, а одноэлектронное окисление H_2O_2 :

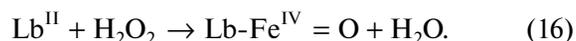


В ходе этой реакции образуется супероксид и далее происходит деградация гема [47].

Lb взаимодействует с H_2O_2 не только в окисленной, но и в оксигенированной форме. В этом случае гемовая группа разрушается, высвобождая

Fe^{2+} , который восстанавливает H_2O_2 до высокоактивных гидроксильных радикалов.

Участвовать в пероксидажном каталитическом цикле может и deoxyLb, количество которого в клубеньках велико ~70–80% [48, 49]:



Биологическая роль пероксидазной активности Lb. Если биологическая функция истинных пероксидаз заключается в свободнорадикальном окислении различных органических субстратов пероксидом водорода и другими пероксидами, а также в антиоксидантной защите, то биологическое значение пероксидазных свойств гемоглобинов двояко: они катализируют и образование, и разложение пероксидазов [29, 30, 50]. Поэтому биологические последствия пероксидазной реакции гемоглобинов зависят от баланса между элиминацией пероксида (антиоксидантная защита) и продукцией свободных радикалов (окислительное повреждение). Этот баланс зависит от восстановительного статуса клеток, а именно от концентрации низкомолекулярных антиоксидантов: глутатиона, аскорбиновой и мочевиной кислот [12, 51].

Гемоглобины изначально не предназначены для взаимодействия с гидропероксидами. Они проявляют пероксидазную активность только тогда, когда меняются характеристики их активного центра. Это может происходить либо из-за изменения внешних условий (рН, окислительно-восстановительное состояние), либо как результат действия веществ-активаторов (посттрансляционные модификаторы аминокислотных остатков, гемовые лиганды). Например, в цитоглобинах такими активаторами служат анионные липиды, которые запускают структурные перестройки белка, ведущие к его переходу из гексакоординированного состояния в пентакоординированное, делая гем доступным для гидропероксидной группы $ROOH$ [52].

Обсуждается вклад псевдопероксидазной активности гемоглобинов в антиоксидантную защиту. Например, пероксидазная активность Mb может быть частью антиоксидантной системы сердечных и скелетных мышц, особенно в условиях интенсивной работы или при гипоксии [27, 53]. Причем за счет пероксидазной реакции Mb может участвовать в детоксикации этанола и ацетальдегида, восстанавливающих ferrylMb. Имеются данные, свидетельствующие о способности невключенного Hb (deoxyHb и metHb) защищать клетки от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями H_2O_2 [54, 55]. Цитоглобин и нейроглобин также могут вносить свой вклад в антиоксидантную защиту клеток, устраняя избыток пероксидов [56].

Пероксидазная активность Lb может иметь биологическое значение при старении корневых клубеньков, когда повышается концентрация metLb

[16, 23, 37, 57]. Старение клубеньков также сопровождается смещением рН в кислую сторону [58], что способствует усилению пероксидазной активности Lb и связанного с этим перекисного окисления липидов. Кроме того, в результате старения клубеньков возрастает количество гемового комплекса Lb с никотиновой кислотой (NA) — Lb^{III}-NA [23]. Образование Lb^{III}-NA в стареющих клубеньках предотвращает развитие окислительных процессов, вызванных metLb, поскольку этот комплекс не подвергается окислению пероксидом водорода до оксоферрильных интермедиатов [17].

Возможно существование механизмов, повышающих пероксидазную активность Lb при окислительном стрессе. Например, в Mb ковалентное связывание гема с белком (Mb-X) под действием H₂O₂ увеличивает пероксидазную активность [53]. Хотя Lb во многом подобен миоглобину, неизвестно, происходит ли активация его пероксидазной функции таким же способом, хотя при взаимодействии с пероксидами в Lb также происходит пришивка гема к белку через остаток тирозина. Это приводит к образованию зеленого соединения со спектральными характеристиками, отличными от феррил- и мет-формы Lb, так называемого леглоглобина. Это соединение отличается от обратимого Mb-X, поскольку не восстанавливается аскорбатом [59].

Таким образом, Lb может функционировать как пероксидаза по отношению к органическому гидропероксиду — пероксиду *трет*-бутила. Органические гидроперекиси в больших количествах могут образовываться в клетках клубенька при развитии окислительного стресса [60]. Несмотря на то, что по каталитической активности Lb значительно уступает истинным пероксидазам, учитывая высокую концентрацию этого гемопротеида в клетках клубенька, он может обеспечить дополнительную антиоксидантную защиту в этих условиях. К тому же включение Lb в пероксидазный каталитический цикл может быть более эффективным и быстрым клеточным ответом на окислительный стресс, чем синтез *de novo* истинных цитоплазматических пероксидаз.

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verma D.P.S., Bal A.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 11. P. 3843–3847.
2. Layzell D.B., Atkins C.A. // In: *Plant Metabolism*. / Eds. D.T. Dennis et al. Harlow, Essex, UK: Longman, 1997. P. 495–505.

3. Topunov A.F., Rozov F.N., Petrova N.E. // Russian J. Plant Physiol. 1998. V. 45. № 6. P. 814–819.
4. Vinogradov S.N., Hoogewijs D., Bailly X., Mizuguchi K., Dewilde S., Moens L., Vanfleteren J.R. // Gene. 2007. V. 398. № 1. P. 132–142.
5. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 6. P. 627–653.
6. Reeder B.J., Wilson M.T. // Free Radic. Biol. Med. 2001. V. 30. P. 1311–1318.
7. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 12–13. P. 1575–1593.
8. Keilin D., Hartree E.F. // Nature. 1950. V. 166. № 4221. P. 513–514.
9. George P., Irvine D.H. // Biochem. J. 1952. V. 52. P. 511–517.
10. Franzen S., Gilvey L.B., Belyea J. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1. P. 1718–2294.
11. D’Angelo P., Lucarelli D., della Longa S., Benfatto M., Hazemann J. L., Feis A., Smulevich G., Ilari A., Bonamore A., Boffi A. // Biophys. J. 2004. V. 86. P. 3882–3892.
12. Ferreira J.C., Marcondes M.F., Icimoto M.Y., Cardoso T.H.S., Tofanello A., Pessoto F.S., Miranda E.G.A., Prieto T., Nascimento O.R., Oliveira V., Nantes I.L. // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 8. e0136554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136554>
13. Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 6689–6699.
14. Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Sokolov A.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Buko I.V., Konstantinova E.E., Chherenkevich S.N., Panasenko O.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. V. 155. № 1. P. 118–121.
15. Reeder B.J. // Antioxid. Redox Signal. 2017. V. 26. P. 763–776.
16. Sievers G., Rönnberg M. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 533. № 2. P. 293–301.
17. Puppo A., Rigaud J., Job D., Ricard J., Zeba B. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 614. № 2. P. 303–312.
18. Davies M.J., Puppo A. // Biochem. J. 1992. V. 281. № 1. P. 197–201.
19. Riggs A. // Methods in Enzymology. 1981. V. 76. P. 5–29.
20. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. № 3. P. 313–319.
21. Лебедева О.В., Узарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1977. V. 42. № 8. P. 1372–1379.
22. Захарова Г.С., Упоров И.В., Тишков В.И. // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 37–64.
23. Klucas R.V., Appleby C.A. // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 2. P. 551–555.
24. Singh S., Varma A. // In: *Rhizobium Biology and Biotechnology*. Eds. / A.P. Hansen Luxembourg: Springer, 2017. P. 309–330.
25. Davies M.J., Mathieu C., Puppo A. // Adv. Inorg. Chem. 1999. V. 46. P. 495–542.
26. Svistunenko D.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1707. P. 127–155.
27. Mannino M.H., Patel R.S., Eccardt A.M., Perez Mag-nelli R.A., Robinson C.L.C., Janowiak B.E., Warren D.E., Fisher J.S. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2019. V. 234. P. 9–17.
28. Appleby C.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 188. P. 222–229.

29. Fantone J., Jester S., Loomis T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 9408–9411.
30. Rodriguez-Malaver A.J., Leake D.S., Rice-Evans C.A. // FEBS Lett. 1997. V. 406. P. 37–41.
31. Vlasova I.I. // Molecules. 2018. V. 23. 10. P. 2561.
32. Huang L., Wojciechowski G., Ortiz de Montellano P.R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 18983–18988.
33. Auer M., Nicolussi A., Schütz G., Furtmüller P.G., Obinger C.J. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 45. P. 31480–31491.
34. Singh P.K., Iqbal N., Sirohi H.V., Bairagya H.R., Kaur P., Sharma S., Singh T.P. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2018. V. 133. P. 49–55.
35. de Montellano P.R.O. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 36. P. 21833–21844.
36. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. // Успехи биологической химии. 2006. V. 46. P. 303–322.
37. Moreau S., Davies M.J., Mathieu C., Herouart D., Puppo A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 51. P. 32557–32562.
38. Moreau S., Davies M.J., Puppo A. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1251. № 1. P. 17–22.
39. Arredondo-Petter R., Esamilla E. // Plant Molecular Biology Reporter. 1991. V. 9. № 3. P. 195–207.
40. Sivistunen D.A., Dunne J., Fryer M., Nicholls P., Reeder B.J., Wilson M.T., Bigotti M.G., Cutruzzolà F., Cooper C.E. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 2845–2855.
41. Reeder B.J., Grey M., Silaghi-Dumitrescu R.L., Sivistunen D.A., Bülow L., Cooper C.E., Wilson M.T. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 30780–30787.
42. Reeder B.J., Sivistunen D.A., Cooper C.E., Wilson M.T. // Antioxid. Redox Signal. 2004. V. 6. P. 954–966.
43. Puppo A., Monny C., Davies M.J. // Biochem. J. 1993. V. 289. P. 435–438.
44. Saari L.L., Klucas R.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 912. № 2. P. 198–202.
45. Becana M., Salin M.L., Ji L., Klucas R.V. // Planta. 1991. V. 183. № 4. P. 575–583.
46. Giulivi C., Davies K.J.A. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 19453–19460.
47. Nagababu E., Rifkind J.M. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 12503–12511.
48. Puppo A., Halliwell B. // Planta. 1988. V. 173. P. 405–410.
49. Becana M., Klucas R.V. // Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 1217–1221.
50. Kanner J., Harel S. // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 237. P. 314–321.
51. Cooper C.E., Silaghi-Dumitrescu R., Rukengwa M., Alayash A.I., Buehler P.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. P. 1415–1420.
52. Tejero J., Kapralov A.A., Baumgartner M.P., Sparacino-Watkins C.E., Anthony-Mutu T.S., Vlasova I.I., Camacho C.J., Gladwin M.T., Bayir H., Kagan V.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1861. № 5. P. 381–401.
53. Mannino M.H., Patel R.S., Eccardt A.M., Janowiak B.E., Wood D.C., He F., Fisher J.S. // Antioxidants. 2020. V. 9. № 6. e549. <https://doi.org/10.3390/antiox9060549>
54. Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G., Buehler P.W., Schaer D.J. // Antioxid. Redox Signal. 2010. V. 12. P. 185–198.
55. Schaer D.J., Buehler P.W., Alayash A.I., Belcher J.D., Vercellotti G.M. // Blood. 2013. V. 121. P. 1276–1284.
56. Li D., Chen X.Q., Li W.J., Yang Y.H., Wang J.Z., Yu A.C. // Neurochem. Res. 2007. V. 32. P. 1375–1380.
57. Lee K.-K., Shearman L.L., Erickson B.K., Klucas R.V. // Plant. Physiol. 1995. V. 109. № 1. P. 261–267.
58. Pladys D., Barthe P., Rigaud J. // Plant Sci. 1988. V. 56. P. 99–106.
59. Moreau S., Davies M.J., Puppo A. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1251. № 1. P. 17–22.
60. Evans P.J., Gallesi D., Mathieu C., Hernandez M.J., de Felipe M., Halliwell B., Puppo A. // Planta. 1999. V. 208. P. 73–79.

Peroxidase Activity of Leghemoglobin of the Bean (*Vicia faba* L.) Nodules in Relation to *tert*-Butyl Hydroperoxide

O. V. Kosmachevskaya^a, E. I. Nasybullina^a, and A. F. Topunov^{a, *}

^a *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Leghemoglobin (Lb) – hemoglobin of legume nodules, like many other hemoglobins, demonstrates peroxidase activity and can oxidize various substances with the participation of H₂O₂ or organic peroxides. The peroxidase activity of Lb isolated from bean nodules (*Vicia faba* L.) was studied in reaction with *tert*-butyl hydroperoxide, an analog of organic hydroperoxides, and *o*-dianisidine as a reducing substrate. The reaction catalyzed by Lb had classical Michaelis kinetics ($V_{\max} = 1.3$ M/min mM of heme, $K_m = 0.8$ mmol/L). The concentrations of substrates not limited the peroxidase reaction rate were determined – 0.8 mmol/L for *o*-dianisidine and 1 mmol/L for *tert*-butyl hydroperoxide. With pH decrease from 9 to 6, Lb peroxidase activity increased almost twice. This may be important for nodules *in vivo*, for example, during their aging, when pH decreases and oxidized Lb content increases. Although Lb is inferior in peroxidase activity to the true peroxidases, it can provide additional antioxidant protection under oxidative stress, considering its high concentration in nodules.

Keywords: leghemoglobin, hemoglobin, myoglobin, horse radish peroxidase, pseudoperoxidase activity, *tert*-butyl hydroperoxide

УДК 577.218

АКТИВАЦИЯ БИОСИНТЕЗА СТИЛЬБЕНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВИНОГРАДА ПРИ ПОМОЩИ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЭНДОФИТОВ ДИКОРАСТУЩЕГО ВИНОГРАДА *Vitis amurensis* RUPR.

© 2022 г. О. А. Алейнова¹, *, Н. Н. Нитяговский¹, А. Р. Супрун¹, К. В. Киселёв¹

¹Федеральный научный центр Биоразнообразия Наземной Биоты Восточной Азии, ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 21.05.2021 г.

После доработки 04.06.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Предложен новый подход к увеличению продукции и изменению качественного состава стильбенов — ценных для здоровья человека веществ, в культуре клеток винограда при помощи 13 биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. Биопрепараты на основе эндофитных бактерий увеличивали содержание стильбенов в 1.3–1.5 раза, биопрепараты на основе эндофитных грибов — в 2.0–3.5 раза. Максимальное увеличение общего содержания стильбенов наблюдали при культивировании клеток винограда в течение 3 сут с 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. — 3.07 мг/г сухой биомассы клеток. Увеличение содержания стильбенов при использовании биопрепаратов на основе эндофитов в культуре клеток винограда *V. amurensis* происходило за счет достоверного увеличения экспрессии генов биосинтеза стильбенов — фенилаланин-аммиак-лиаз (*PAL*) и стильбен-синтазы (*STS*). Биопрепараты на основе природных эндофитов *V. amurensis* являются перспективным и экологичным стимулятором увеличения содержания стильбенов в культуре клеток винограда.

Ключевые слова: эндофиты винограда, биосинтез стильбенов, культура клеток винограда, ресвератрол, стильбены, стильбен-синтазы (*STS*), фенилаланин аммиак лиазы (*PAL*), эндофиты, *Vitis amurensis*

DOI: 10.31857/S0555109922010020

Стильбены — относительно небольшая группа природных фенольных соединений, которые встречаются в ряде неродственных семейств растений, таких как арахис (*Fabaceae*), сосна (*Pinaceae*) или виноград (*Vitaceae*). Известно, что виноград — лидер по содержанию ресвератрола среди растений. Ключевой и наиболее известный стильбен — это *транс*-ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен), который является основным предшественником в биосинтезе остальных стильбенов [1]. Ресвератрол способен предупреждать возникновение и развитие сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, оказывать антиаллергическое действие, замедлять процесс старения [2, 3]. Помимо полезных свойств для здоровья человека, установлено, что стильбены играют также важную роль в защите растений от микробных патогенов [4].

Содержание ресвератрола в растительном сырье не превышает сотых долей процента от сухой массы, что увеличивает стоимость производства стильбенов в промышленных масштабах. На сегодняшний день в биотехнологии существует мно-

жество способов стимуляции биосинтеза стильбенов, но в основном эти подходы основаны на использовании химических веществ, которые могут оказывать неблагоприятное действие на здоровье человека.

В последние годы активно развивается направление, основанное на изучении влияния эндофитов растений и препаратов на их основе на растения, их устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, повышение урожайности и качество плодов, в том числе на содержание вторичных метаболитов. К эндофитам растений относят эндосимбионты, бактерии, грибы, вирусы, которые населяют растение, не вызывая при этом никаких заболеваний [5].

В настоящее время есть несколько работ посвященных изучению влияния эндофитных грибов винограда на метаболизм в культуре клеток винограда. Было показано, что совместное культивирование клеток винограда с разными штаммами грибов приводило к появлению новых метаболитов (от 1 до 11) специфичных для штамма/рода эндо-

фитных грибов, ранее не характерных для культуры клеток винограда [6]. Кроме того, добавление эндофитов-грибов к культуре клеток винограда приводило к изменению профиля первичного и вторичного метаболизма. Изменялись общее содержание сахаров, титруемая кислотность, содержание общего растворимого белка, общее содержание флавоноидов и фенолов, малонового диальдегида, а также активность антиоксидантных ферментов, гваякол-зависимой пероксидазы, супероксиддисмутазы и фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) [7]. Грибы-эндофиты могут продуцировать разные элиситоры или другие сигнальные молекулы, которые в свою очередь могут вызывать различные метаболические изменения, поэтому окислительный ответ может быть обычной реакцией клеток при изменении метаболизма в растениях-хозяевах [8].

Недавно китайские ученые установили, что совместное культивирование каллусов винограда с грибами-эндофитами по-разному влияет на общую концентрацию антоцианов и активность PAL в клетках винограда. При совместном культивировании штаммов грибов *Alternaria alternata* и *Episcoccum nigrum* с клетками винограда содержание антоцианов увеличивалось на 74 и 28% соответственно, в то время как со-культивирование другого штамма *A. alternata* с каллусами винограда снижало содержание антоцианов на 19% [9]. Таким образом, совместное культивирование каллусов винограда и грибов-эндофитов индуцировало защитные реакции клеток винограда, приводящее к метаболическим изменениям.

Дикий виноград *V. amurensis*, произрастающий на Дальнем Востоке (Россия), является уникальным растением, поскольку выдерживает довольно низкие температуры, а также содержит больше всего стильбенов, по сравнению с другими видами винограда [10, 11]. Эндофиты дикого винограда *V. amurensis* в настоящее время практически не изучены, но являются интересным объектом для исследований, поскольку находятся в природной среде, и, возможно, способствуют устойчивости дикорастущего винограда к абиотическим и биотическим стрессам. Ранее [12] было показано, что добавление нативных эндофитных бактерий и грибов к культуре клеток винограда достоверно увеличивало содержание стильбенов (в 2.2–16.3 раза), но ингибировало рост клеток. Стимуляция биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи жизнеспособных клеток эндофитов неэффективна и не применима в производстве, поскольку скорость роста бактерий и грибов значительно выше, чем клеток культуры винограда. Создание для производства альтернативных элиситоров/биопрепаратов на основе эндофитов винограда в этом случае может способствовать стимуляции биосинтеза стильбенов.

Цель работы – получение новых биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов винограда *V. amurensis*, анализ их влияния на продукцию ресвератрола, качественный состав стильбенов и экспрессию генов биосинтеза ресвератрола и его предшественников, а именно генов *PAL* и *STS*, в культуре клеток винограда.

МЕТОДИКА

Выделение и идентификация штаммов эндофитных бактерий и грибов винограда *V. amurensis*. Стебли и листья дикорастущего винограда *V. amurensis* (молодые стебли длиной 7–8 см с тремя здоровыми листьями) были отобраны в неохраямой природной зоне в районе г. Владивостока (Россия) в июне–сентябре 2018–2020 гг. Каждый образец растения доставлялся в лабораторию в течение 30 мин. Ткани листа и стебля (1.5 г) промывали под проточной водой с мылом, затем в стерильных условиях промывали в 75%-ном спирте в течение 2 мин, а затем 1 мин в 10%-ном растворе пероксида водорода и затем стерильной водой 5 раз. Для проверки эффективности выбранного способа поверхностной стерилизации и отсутствия микроорганизмов 100 мкл последней промывной воды растирали шпателем на чашках Петри с агаризованной картофельно-декстрозной питательной средой (PDA, “Neogene”, Великобритания) для грибов и агаризованной средой R2A для бактерий [13]. После трехдневной инкубации рассева последней промывной воды на чашках с питательными средами не было выявлено роста микроорганизмов, что подтверждало качественную поверхностную стерилизацию тканей винограда.

В стерильной ступке поверхностно стерилизованную ткань листьев и стеблей дикого винограда измельчали до однородного состояния, отжимали сок и наносили 100 мкл полученного сока на чашки Петри со средой PDA и R2A. Через три дня (для бактерий) и пять дней (для грибов) выросшие колонии бактерий и грибные изоляты отбирали и осторожно переносили на новую стерильную чашку для повторного культивирования.

Выделение ДНК отдельных колоний бактерий и грибов проводили методом с гексадецилтриметиламмония бромидом (СТАВ) с модификациями [14]. Для получения последовательности генов *16S* рРНК размером приблизительно 1500 п.н. для амплификации использовали универсальные праймеры 8F, 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG и 1522R, 5'AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA [15]. Универсальные праймеры 5'AGG AGA AGT CGT AAC AAG G и 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC были использованы для амплификации последовательности межгенного спейсера ITS1 размером ~560 п.н. [16]. ПЦР-продукты секвенировали с помощью генетического анализатора

ABI 3130 (“Applied Biosystems”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа последовательности использовалась программа Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Множественные выравнивания последовательностей были выполнены с помощью программы ClustalX [17]. Идентичность последовательности $\geq 99\%$ считали достаточным пороговым значением для таксономической идентификации.

Получение биопрепаратов на основе эндофитов винограда *V. amurensis*. Для создания биопрепаратов на основе эндофитов винограда были выбраны наиболее часто встречающиеся 7 родов эндофитных бактерий и 6 родов эндофитных грибов. Эндофитные бактерии и грибы выращивали в 50 мл жидких питательных сред R2A (для бактерий) и PD (для грибов) при 23°C в темноте при постоянном перемешивании 130 об./мин. Полученные суспензии эндофитных бактерий и грибов переносили в пробирки на 50 мл (типа фалькон) и центрифугировали на центрифуге СМ-6М (“ELMI ltd.”, Латвия) 5 мин при 2100 g. Полученный осадок сушили в термостате при 45°C до полного видимого испарения влаги в течение 5 сут. Полученный сухой осадок эндофитных бактерий и грибов автоклавировали при 120°C и 0.8 атм. 20 мин.

Обработка клеток винограда биопрепаратом на основе эндофитов винограда *V. amurensis*. Каллусная культура V7 была получена в 2017 г. из молодых лиан взрослого растения *V. amurensis*, как описано в работе [18]. Для получения 50 мл суспензионной клеточной культуры винограда V7 использовали 2.0 г сырой биомассы каллуса V7, взятой на 30 сут выращивания, так как ранее было показано, что на 30–35 сут выращивания наблюдали самые высокие показатели биосинтеза стильбенов в каллусах винограда [19].

Для культивирования суспензии клеток винограда использовали жидкую модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, следующего состава: NH_4NO_3 – 0.4 г/л, KNO_3 – 1.9 г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.44 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.37 г/л, KH_2PO_4 – 0.17 г/л, H_3BO_3 – 6.2 мг/л, MnSO_4 – 16.9 мг/л, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 мг/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 мг/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8.6 мг/л, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.25 мг/л, KI – 0.83 мг/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27.8 мг/л, $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 37.3 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, пептон ферментативный для бактериологических питательных сред сухой – 100 мг/л, витамин В1 – 0.2 мг/л, витамин В6 – 0.5 мг/л, витамин РР – 0.5 мг/л, L-цистеин – 5 мг/л, сахароза – 25 г/л, 6-бензиламинопурин – 0.5 мг/л, альфа-нафтилуксусная кислота – 2 мг/л.

Культуру клеток винограда V7 выращивали в 50 мл питательной среды в темноте на орбитальном шейкере (110 об./мин) при температуре 23°C в течение 7 сут. Затем в стерильных условиях

колбу добавляли по 10 мг полученных биопрепаратов эндофитных бактерий и по 10 и 20 мг биопрепаратов эндофитных грибов. Предварительно биопрепараты растирали в ступках в порошок в стерильных условиях. Для оценки влияния биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов на рост биомассы, содержание и продукцию стильбенов клетки винограда V7 культивировали с биопрепаратами в течение 3 и 7 сут (все-го 10 и 14 сут соответственно). Эксперименты повторяли 3 раза.

Выделение РНК, получение комплементарной ДНК (кДНК) и количественная оценка экспрессии генов *PAL* и *STS*. Выделение РНК проводили из 10-суточной культуры клеток V7, что соответствовало 3 сут после внесения биопрепаратов на основе эндофитов. Полную изоляцию РНК проводили с использованием СТАВ-протокола [20]. Комплементарные ДНК были синтезированы как описано ранее [21]. Количественный ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) проводили с помощью флуоресцентного красителя EvaGreen (“Biotium”, США), используя набор реагентов ПЦР-комплект для ПЦР в реальном времени в соответствии с рекомендациями производителя (“Синтол”, Россия), как описано в работе [22]. Для амплификации использовали прибор DT-prime с функцией детекции результатов в реальном времени (“ДНК Технология”, Россия).

Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения RealTime_PCR v.7.3 (“ДНК Технология”, Россия), обсчет – по методу $\Delta\Delta C_t$ [23]. Данные ПЦР-РВ были получены на кДНК из двух независимых экспериментов. Для образцов кДНК каждого эксперимента было сделано 6 аналитических повторностей на каждую пробу (3 были нормализованы к гену *Actin*, 3 к *Gapdh*). Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах. Последовательность праймеров, используемых для анализа экспрессии, а также идентификационные номера генов *PAL* и *STS* в базе данных (GenBank, NCBI) представлены в ранее опубликованной работе [24].

Определение содержания стильбенов в клетках винограда *V. amurensis*. Высушенные, порошокобразные образцы культуры V7 (100 мг) экстрагировали 2 мл 95%-ного этанола в течение 2 ч при 60°C, затем очищали с помощью нейлоновых шприц-фильтров OlimPeak, размер пор 0.45 мкм, диаметр 13 мм (“Teknokroma”, Испания) и далее проводили анализ методом ВЭЖХ. Измерение для каждого образца повторяли 3 раза.

Идентификацию и количественную оценку всех стильбенов проводили с использованием

аналитической системы ВЭЖХ LC-20AD XR (“Shimadzu”, Япония) и коммерчески доступных стандартов. Данные ВЭЖХ с диодно-матричной детекцией были записаны в диапазоне 200–500 нм, хроматограммы для количественного определения были получены при 310 нм. Хроматографическое разделение проводили на колонке Shimpack GIST C18 (150 мм, 2.1 мкм i.d., размер детали 3 мкм, “Shimadzu”, Япония).

Экстракты из культур клеток разделяли с использованием 0.1%-ной муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила (В) в качестве подвижных фаз, со следующим профилем элюирования: от 0 до 35 мин 0% В; от 35 до 40 мин, 40% В; от 40 до 50 мин, 50% В; от 50 до 65 мин 100% В. Экстракт образца (3 мкл) вводили при постоянной температуре колонки 40°C и скорости потока, поддерживаемой на уровне 0.2 мл/мин.

Содержание стильбенов определяли с помощью внешних стандартов с использованием калибровочных кривых пятиточечной регрессии, построенных с использованием доступных стандартов. Аналитические стандарты *транс*-ресвератрол, *транс*-пицеид, *транс*-пицеатаннол – фирмы “Sigma-Aldrich” (США), *дельта*-виниферин – фирмы “Panreac AppliChem” (Германия). *Цис*-изомеры ресвератрола и пицеида были получены под воздействием солнечного света на соответствующий стандартный раствор, содержащий *транс*-изомер, как сообщалось ранее [20].

Статистический анализ полученных результатов. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для всех тестов был выбран уровень значимости 0.05. Данные по содержанию стильбенов в культуре клеток винограда V7 после обработки эндофитными биопрепаратами получены с использованием трех биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор эндофитов винограда для получения биопрепаратов на основе эндофитов. Ранее было изучено разнообразие биологического сообщества эндофитов винограда – бактерий и грибов (не опубликованные данные). Выявлено, что по количественному соотношению выросших на чашках колоний, наиболее часто встречаются в тканях винограда бактерии представители родов *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, и грибы представители родов *Alternaria*, *Biscogniauxia*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Fusarium*, *Trichoderma*. Штаммы представители этих родов были отобраны для получения биопрепаратов на основе эндофитов. Были выделены образцы ДНК 7 штаммов бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp.,

Pantoea sp., *Pseudomonas* sp., *Xantomonas* sp. и 6 изолятов грибов *Alternaria* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. Далее секвенировали участки 16S рРНК для бактерий и участок межгенного спейсера ITS1 для грибов и определяли процент идентичности с ранее известными штаммами микроорганизмов при помощи специализированной программы NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1) [12].

Влияние биопрепаратов на основе эндофитов винограда *V. amurensis* на биомассу клеток винограда V7. Для анализа влияния биопрепаратов на основе эндофитов на биомассу клеток винограда, в 7-суточную культуру добавляли биопрепараты и продолжали культивирование в течение 3 и 7 сут. По окончании времени клетки извлекали из жидкой питательной среды, высушивали до постоянного веса и взвешивали.

После 3 сут культивирования клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе бактерий биомасса высушенных клеток не изменялась (рис. 1а). Добавление 20 мг биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* sp. и *Fusarium* sp. снижало биомассу клеток в 1.5 и 1.2 раза (рис. 2а). После 7 сут культивирования с биопрепаратами на основе *Curtobacterium* sp. и *Xantomonas* sp. также достоверно уменьшалась сухая масса клеток относительно контроля (рис. 1г). При культивировании клеток винограда с 20 мг биопрепарата на основе грибов *Alternaria* sp. и *Cladosporium* sp. в течение 7 сут наблюдалось небольшое увеличение биомассы клеток (рис. 2г). В то же время добавление 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. достоверно снижало биомассу клеток. Остальные биопрепараты на основе эндофитов достоверно не влияли на прирост биомассы клеток V7 (рис. 1а, 1г и рис. 2а, 2г).

Содержание стильбенов в культуре клеток винограда V7 при добавлении биопрепаратов на основе эндофитов. После добавления в 7-суточную суспензию клеток винограда V7 биопрепаратов на основе эндофитов через 3 и 7 сут методом ВЭЖХ анализировали общее содержание стильбенов.

При культивировании клеток V7 с внесенными биопрепаратами на основе эндофитных бактерий *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xantomonas* sp. за 3 сут общее содержание стильбенов увеличивалось в 1.3–1.5 раза относительно контроля (рис. 1б). Культивирование клеток винограда в течение 7 сут совместно с биопрепаратами на основе бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp. и *Pantoea* sp. увеличивало общее содержание стильбенов в 1.7–2.6 раза относительно контроля (рис. 1д).

При 3-суточном культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе отобранных эндофитных грибов достоверно увеличивалось общее содержания стильбенов в пределах

Таблица 1. Характеристики бактерий и грибов на основе последовательностей генов *16S* рРНК (бактерии) и межгенного спейсера *ITS1* (грибы), используемых в экспериментах, выделенных из микробиома винограда *V. amurensis*

№	Последовательность	Род и идентификатор последовательности*	Близкий вид и идентификатор последовательности	Процент идентичности
1	<i>16S</i> рРНК	<i>Agrobacterium</i> (MZ424738)	<i>Agrobacterium rubi</i> (MN752429.1)	99.17%
2	<i>16S</i> рРНК	<i>Bacillus</i> (MZ424739)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (KU179338.1)	100%
3	<i>16S</i> рРНК	<i>Curtobacterium</i> (MZ424740)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (AJ310414.1)	100%
4	<i>16S</i> рРНК	<i>Erwinia</i> (MZ424741)	<i>Erwinia billingiae</i> (KM408608.1)	100%
5	<i>16S</i> рРНК	<i>Pantoea</i> (MZ424742)	<i>Pantoea agglomerans</i> (MT605813.1)	99.75%
6	<i>16S</i> рРНК	<i>Pseudomonas</i> (MZ424743)	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> (MN813762.1)	99.89%
7	<i>16S</i> рРНК	<i>Xanthomonas</i> (MZ424744)	<i>Xanthomonas campestris</i> (MN108237.1)	99.13%
8	<i>ITS1</i>	<i>Alternaria</i> (MZ427922)	<i>Alternaria tenuissima</i> (KF308883.1)	100%
9	<i>ITS1</i>	<i>Biscogniauxia</i> (MZ427923)	<i>Biscogniauxia maritima</i> (MN341558.1)	100%
10	<i>ITS1</i>	<i>Cladosporium</i> (MZ427924)	<i>Cladosporium perangustum</i> (MT645918.1)	100%
11	<i>ITS1</i>	<i>Didymella</i> (MZ427925)	<i>Didymella negriana</i> (MK100201.1)	100%
12	<i>ITS1</i>	<i>Fusarium</i> (MZ427927)	<i>Fusarium tricinctum</i> (MT446111.1)	100%
13	<i>ITS1</i>	<i>Trichoderma</i> (MZ427928)	<i>Trichoderma harzianum</i> (MT422092.1)	98.97%

* Полученные нуклеотидные последовательности собирали с помощью программы Staden Package. Процент идентичности собранных нуклеотидных последовательностей определялся с помощью специализированной программы NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), используя алгоритм Nucleotide Blast (nucleotide – nucleotide BLAST) [12].

1.5–3.5 раза во всех анализируемых образцах. Максимальное содержание стильбенов было определено при культивировании клеток винограда в течение 3 сут с биопрепаратами на основе *Fusarium* sp. (20 мг) и *Trichoderma* sp. (10 мг) – 2.68 и 3.07 мг/г сухой биомассы клеток V7 соответственно (рис. 2б). Культивирование с биопрепаратами на основе *Biscogniauxia* sp. и *Trichoderma* sp. в течение 7 сут увеличивало общее содержание стильбенов в 5.6 и 4.7 раза соответственно (рис. 2д).

Необходимо отметить, что общее содержание стильбенов в контрольной культуре клеток значительно снижалось с увеличением времени культивирования. Максимальное значение в контрольной культуре на 10 сут составило 0.88 мг/г сухой биомассы клеток V7, в то время как общее содержание стильбенов в 14-суточной культуре клеток уже в 3 раза меньше 0.29 мг/г. Определение количественного и качественного состава стильбенов проводили на 10 сут (через 3 сут культивирования с биопрепаратами эндофитов) (рис. 1б, 1д и рис. 2б, 2д).

Результаты анализа показали, что при культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе бактерий *Bacillus* sp. и *Erwinia* sp. содержание олигомеров ресвератрола достоверно увеличивалось, а именно *ε*-виниферина в 5.7 и 5.9 раза соответственно, а *δ*-виниферина при добавлении биопрепаратов на основе *Curtobacterium* sp. и *Xanthomonas* sp. в 4 раза (табл. 2). Достоверно увеличивалось содержание *α*-пицеида (в 2.4 раза) при добавлении к культуре клеток

винограда V7 биопрепарата на основе *Pseudomonas* sp. (табл. 2). Таким образом, содержание виниферинов в культуре клеток винограда после добавления биопрепаратов на основе эндофитных бактерий достигало 42–71% от общего количества стильбенов в клетках, при этом количество виниферинов в контроле составляло только 20% от общего количества синтезируемых клетками стильбенов.

Как и при добавлении биопрепаратов на основе бактерий, внесение биопрепаратов на основе отобранных эндофитных грибов достоверно увеличивало процентное соотношение виниферинов во всех анализируемых образцах, до 41–73% от общего содержания стильбенов в культуре клеток винограда V7 (табл.3). Наибольшее увеличение *ε*- и *δ*-виниферинов в клетках винограда V7 было отмечено после культивирования с биопрепаратами на основе *Alternaria* sp. (10 мг), *Fusarium* sp. (20 мг) и *Trichoderma* sp. (10 мг) (табл. 3). При добавлении 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. достоверно увеличивалось содержание *α*-ресвератрола и достигало 0.03 мг/г (табл. 3). Содержание *α*-пицеида и пицетанола увеличивалось после обработки биопрепаратами на основе *Alternaria* sp. и *Didymella* sp. (табл. 3).

Продукция стильбенов в культуре клеток винограда после обработки биопрепаратами на основе эндофитов. Анализ влияния биопрепаратов на основе эндофитов на рост биомассы и общее содержание стильбенов в культуре клеток винограда позволил вычислить общую продукцию стильбе-

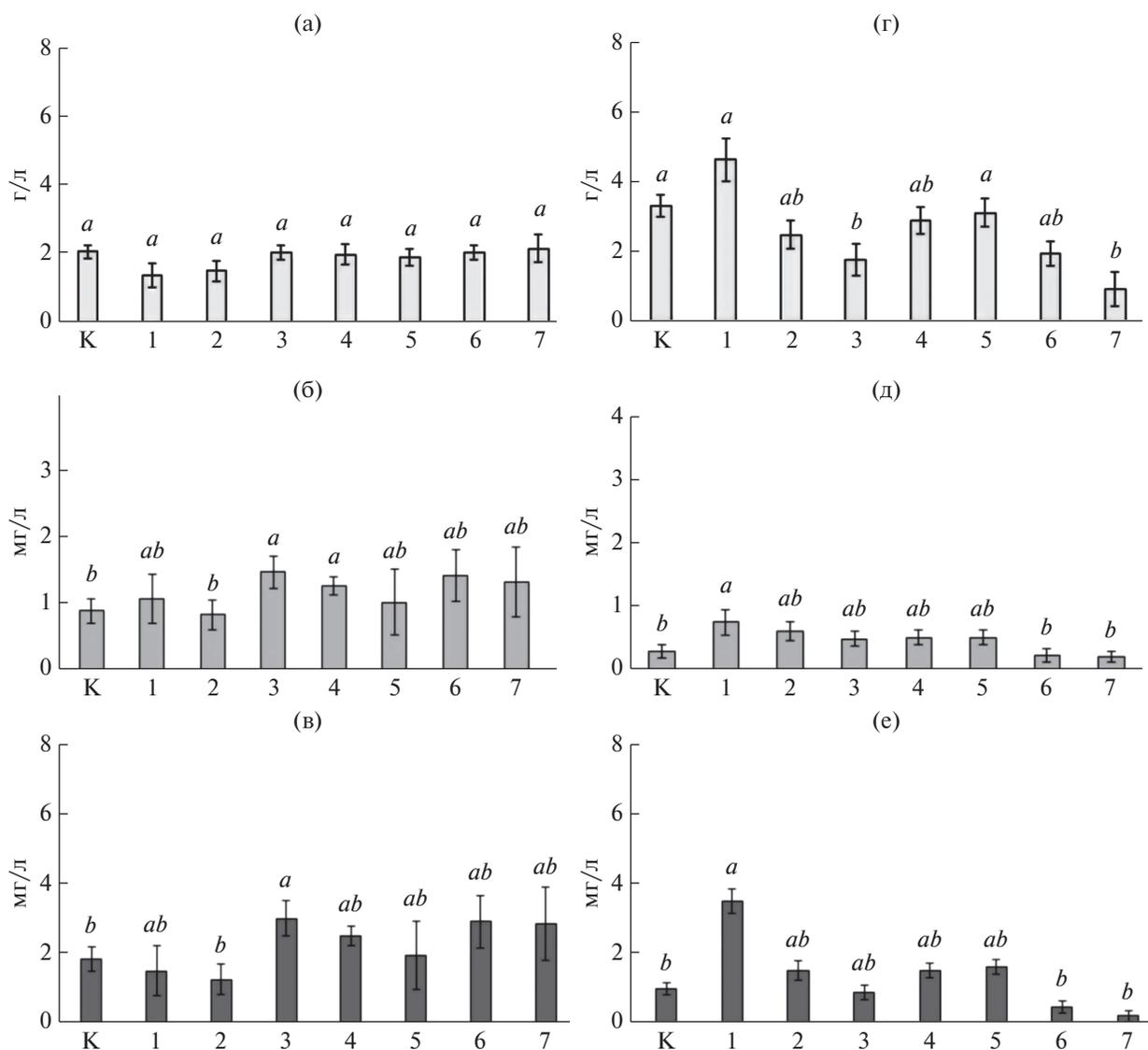


Рис. 1. Характеристика культуры клеток винограда *V. amurensis* V7 на 3 (а–в) и 7 сут (г–е) после внесения биопрепаратов на основе эндофитных бактерий: сухая биомасса клеток (а, г, г/л), общее содержание стильбенов (б, д, мг/л) и продуктивность (в, е, мг/г). К—контрольная культура клеток V7 без добавления биопрепаратов, 1 — биопрепарат на основе *Agrobacterium* sp., 2 — *Bacillus* sp., 3 — *Curtobacterium* sp., 4 — *Erwinia* sp., 5 — *Pantoea* sp., 6 — *Pseudomonas* sp., 7 — *Xanthomonas* sp. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не различались по критерию Стьюдента. $p < 0.05$ считали статистически значимым.

нов в клетках винограда V7 на 3 и 7 сут совместно культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий и грибов.

При добавлении биопрепаратов на основе бактерий продукция стильбенов на 3 сут в культуре клеток увеличивалась в 1.3–1.6 раз (рис. 1в), и в 1.5–3.6 раза относительно контроля на 7 сут (рис. 1е). Среди биопрепаратов на основе бактерий самая высокая продукция стильбенов была отмечена при культивировании в течение 3 сут с биопрепаратом на основе *Curtobacterium* sp. — 3.02 мг/л питательной среды (рис. 1в). На 7 сут максимальная продукция стильбенов наблюдалась при вне-

сении биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. — 3.5 мг/л питательной среды. По-видимому ее увеличение происходило как за счет небольшого увеличения сухой биомассы клеток, так и за счет увеличения содержания стильбенов в клетках в 2.6 раза (рис. 1е).

Самое высокое значение продукции стильбенов было определено при культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе грибных эндофитов в течение 3 сут. Продукция была выше контрольных значений в 1.4–3.7 раза, что было результатом увеличения содержания стильбенов во всех анализируемых пробах

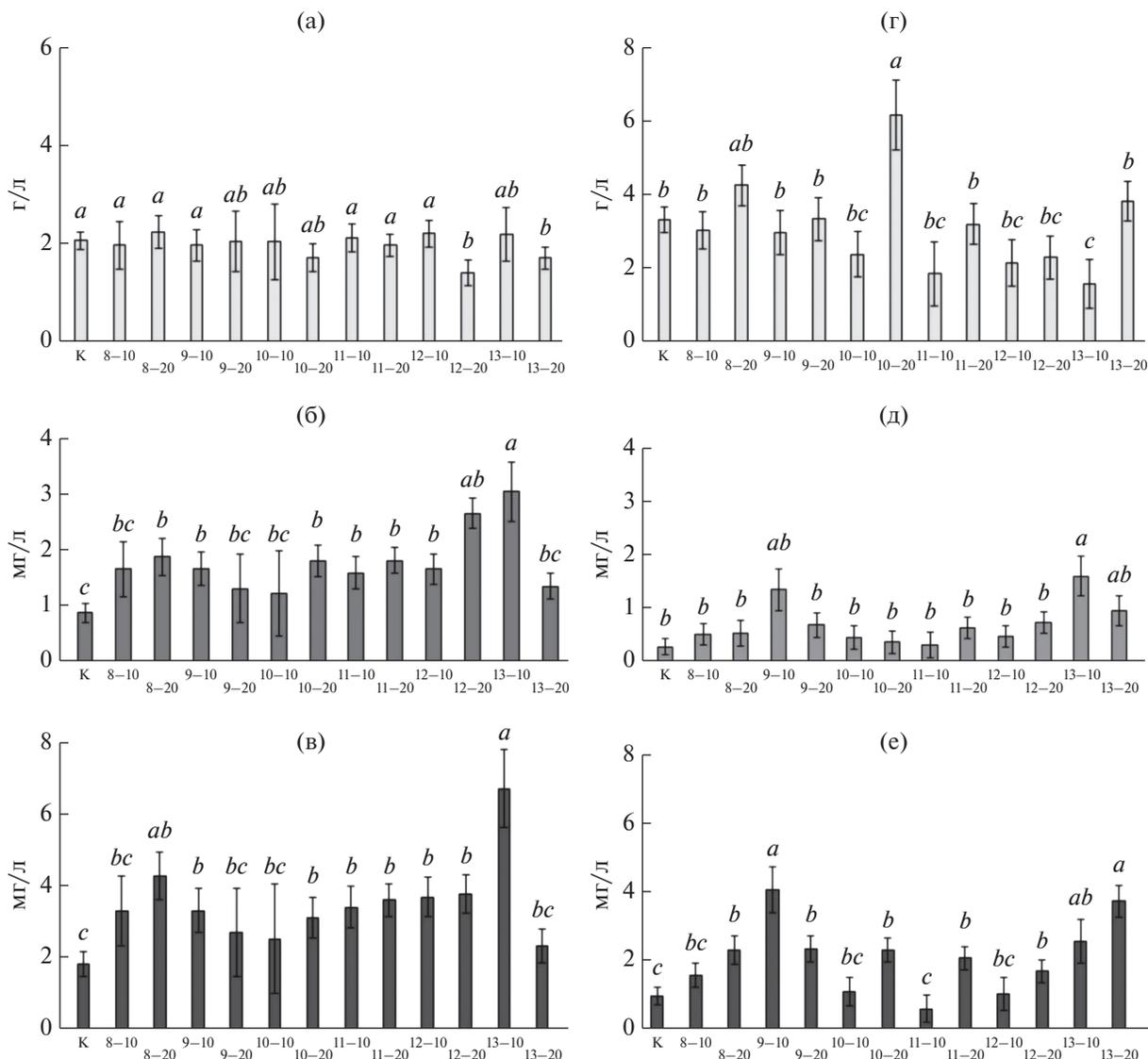


Рис. 2. Характеристика культуры клеток винограда *V. amurensis* V7 на 3 (а–в) и 7 сут (г–е) после воздействия биопрепаратов на основе эндофитных грибов: сухая биомасса (а, г/л), общее содержание стильбенов (б, д, мг/л), продуктивность (в, е, мг/л) клеток суспензионной культуры клеток винограда. К – контроль, культура клеток V7 без добавления биопрепаратов, 8 – биопрепарат на основе *Alternaria* sp., 10 и 20 мг, 9 – *Biscogniauxia* sp., 10 и 20 мг, 10 – *Cladosporium* sp., 10 и 20 мг, 11 – *Didymella* sp., 10 и 20 мг, 12 – *Fusarium* sp., 10 и 20 мг, 13 – *Trichoderma* sp., 10 и 20 мг. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не различались по критерию Стьюдента. $p < 0.05$ считали статистически значимым.

(рис. 2б). Максимальные значения продукции стильбенов в культуре клеток винограда были отмечены на 3 сут культивирования с биопрепаратом на основе гриба *Alternaria* sp. (20 мг) – 4.3 мг/л питательной среды и биопрепаратом на основе *Trichoderma* sp. (10 мг) – 6.8 мг/л питательной среды (рис. 2в).

Биопрепараты на основе эндофитных грибов на 7 сут культивирования увеличивали продукцию стильбенов в 1.6–4.2 раза относительно контроля. Высокие показатели продукции стильбенов на 7 сут культивирования отмечали при внесении

10 мг биопрепарата на основе *Biscogniauxia* sp. – 4.1 мг/л питательной среды и при добавлении 10 и 20 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. – 2.6 и 3.7 мг/л соответственно (рис. 2е).

Анализ экспрессии генов *PAL* и *STS* в культуре клеток винограда после обработки биопрепаратами на основе эндофитов. Для того чтобы доказать, что увеличение общего содержания стильбенов в культуре клеток после обработки биопрепаратами на основе эндофитов происходило за счет активации биосинтеза стильбенов, была проанализирована экспрессия ключевых генов биосинтеза

Таблица 2. Содержание стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3 дней культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий (мг/г сухой биомассы)

Стильбен	V7-К	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Curtobacterium</i> sp.	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Xantomonas</i> sp.
Дигликозид-ресвератрол	0.32 ± 0.05	0.25 ± 0.08	0.09 ± 0.03	0.36 ± 0.11	0.54 ± 0.09	0.31 ± 0.26	0.37 ± 0.128	0.32 ± 0.11
Пицеид	0.17 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.24 ± 0.13	0.12 ± 0.05	0.19 ± 0.16	0.30 ± 0.25	0.14 ± 0.08
<i>транс</i> -Ресвератрол	0.20 ± 0.16	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.05	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.04
<i>эпсилон</i> -Виниферин	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.05	0.18** ± 0.09	0.09 ± 0.02	0.18* ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.04
<i>дельта</i> -Виниферин	0.16 ± 0.04	0.60 ± 0.18	0.41 ± 0.14	0.68* ± 0.08	0.35 ± 0.13	0.34 ± 0.01	0.57 ± 0.04	0.69* ± 0.26
<i>цис</i> -Ресвератрол	0.003 ± 0.002	0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.002 ± 0.002	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
<i>цис</i> -Пицеид	0.01 ± 0.01	0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02* ± 0.02	0.01 ± 0.01
Пицестанол	0.002 ± 0.001	0	0	0	0	0	0	0

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, культивированных контрольных условиях без биопрепаратов на основе эндофитов.

Таблица 3. Содержание стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3 сут культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных грибов (мг/г сухого веса клеток)

Стильбен	V7-К	<i>Alternaria</i> sp.		<i>Biscogniauxia</i> sp.		<i>Cladosporium</i> sp.		<i>Didymella</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.		<i>Trichoderma</i> sp.	
		10 мг	20 мг	10 мг	20 мг	10 мг	20 мг	10 мг	20 мг	10 мг	20 мг	10 мг	20 мг
Дигликозид-ресвератрол	0.32 ± 0.05	0.31 ± 0.12	0.39 ± 0.10	0.22 ± 0.18	0.18 ± 0.16	0.30 ± 0.27	0.47 ± 0.12	0.41 ± 0.01	0.49 ± 0.05	0.39 ± 0.07	0.54 ± 0.22	0.42 ± 0.02	0.30 ± 0.05
Пицеид	0.17 ± 0.04	0.25 ± 0.16	0.24 ± 0.11	0.16 ± 0.13	0.11 ± 0.09	0.19 ± 0.15	0.21 ± 0.1	0.39 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.16 ± 0.06	0.26 ± 0.01	0.17 ± 0.063	0.13 ± 0.01
<i>транс</i> -Ресвератрол	0.20 ± 0.16	0.14 ± 0.03	0.45 ± 0.34	0.13 ± 0.08	0.12 ± 0.10	0.10 ± 0.05	0.11 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.60 ± 0.36	0.20 ± 0.02	0.08 ± 0.05
<i>эпсилон</i> -Виниферин	0.03 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.25 ± 0.10	0.21 ± 0.17	0.33 ± 0.27	0.17 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.32 ± 0.13	0.35 ± 0.25	0.49 ± 0.24	0.17 ± 0.16
<i>дельта</i> -Виниферин	0.16 ± 0.04	0.63 ± 0.11	0.53 ± 0.03	0.95 ± 0.26	0.56 ± 0.02	0.46 ± 0.20	0.87 ± 0.04	0.58 ± 0.06	0.56 ± 0.05	0.66 ± 0.12	0.89 ± 0.03	1.76 ± 0.85	0.66 ± 0.09
<i>цис</i> -Ресвератрол	0.003 ± 0.002	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.013 ± 0.008	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01
<i>цис</i> -Пицеид	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.015 ± 0.010	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.014 ± 0.009	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Пицеэтанол	0.002 ± 0.001	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0	0	0	0	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0	0	0	0

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, клетках, культивированных в контрольных условиях без биопрепаратов на основе эндофитов.

стильбенов в клетках винограда, а именно пяти генов *PAL* и десяти генов *STS*. В эксперименте использовали препараты, которые в большей степени увеличивали общее содержание стильбенов, а именно на основе бактерий *Curtobacterium* sp. и *Xantomonas* sp., и на основе грибов *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. и *Trichoderma* sp. Биопрепарат на основе бактерий *Agrobacterium* sp. достоверно не влиял на содержание стильбенов в культуре клеток винограда при оценке на 3 сут после его внесения (рис. 1б, табл. 2), поэтому проанализированная экспрессия генов *PAL* и *STS* в этом эксперименте была использована в качестве дополнительного контроля.

Анализ экспрессии генов *PAL* после внесения биопрепаратов на основе эндофитов достоверно показал увеличение экспрессии гена *PAL1* в 1.9–9.0 раз во всех культурах клеток, кроме тех, куда были добавлены биопрепараты на основе *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (рис. 3а). Экспрессия гена *PAL2* была достоверно выше (в 5–16 раз) в культуре клеток V7 после добавления биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp., *Cladosporium* sp. и *Fusarium* sp. (рис. 3а). В трех из четырех культур клеток винограда, которые культивировали с биопрепаратами на основе грибов, а именно *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., экспрессия гена *PAL3* достоверно увеличивалась – в пределах 3.4–5.8 раза (рис. 3а). Добавление биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp. и *Cladosporium* sp. в культуру клеток винограда V7 достоверно увеличивали экспрессию генов *PAL4* и *PAL5* в 3.7–9.6 раз по сравнению с контролем (рис. 3а).

Анализ экспрессии генов *STS* показал, что достоверно наблюдали увеличение экспрессии *STS1* в пределах 2.3–3.5 раза при внесении всех анализируемых биопрепаратов, кроме биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (рис. 3б). Экспрессия гена *STS2* и *STS3* была выше в 1.7–2.3 раза после культивирования клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе *Xantomonas* sp. и *Fusarium* sp. Также экспрессия гена *STS2* достоверно увеличивалась при добавлении биопрепарата на основе *Trichoderma* sp., и экспрессия гена *STS3* была выше относительно контроля при добавлении биопрепарата на основе *Cladosporium* sp. (рис. 3б). В то же время, добавление биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. приводило к достоверному ингибированию уровня экспрессии генов *STS2* и *STS3* в клетках винограда (рис. 3б). Уровень экспрессии гена *STS4* достоверно возрастал в 1.6–3.0 раза при добавлении к клеткам винограда биопрепаратов на основе *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. Добавление всех анализируемых биопрепаратов, кроме биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp., достоверно увеличивало уровень экспрессии гена *STS5* (в 3.0–6.8 раз) в культуре клеток винограда V7 (рис. 3б).

Экспрессия гена *STS6* достоверно увеличивалась в клетках винограда при добавлении биопрепаратов на основе *Curtobacterium* sp., *Xantomonas* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. и *Fusarium* sp. в пределах 5.4–12 раз (рис. 3в). Добавление биопрепаратов на основе выбранных грибов и на основе бактерий *Curtobacterium* sp. достоверно увеличивали уровень экспрессии гена *STS7* в 3.5–20 раз в культуре клеток винограда V7, при этом максимальный уровень экспрессии гена *STS7* был отмечен при добавлении биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. (рис. 3в). Уровень экспрессии *STS8* достоверно увеличивался в 9.8–15 раз в клетках винограда при внесении биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp. и *Cladosporium* sp. (рис. 3в), а гена *STS9* в 2.7–6.6 раз после культивирования со всеми выбранными биопрепаратами, кроме *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (рис. 3в). Также во всех анализируемых образцах, кроме клеток обработанных биопрепаратом на основе *Agrobacterium* sp., достоверно увеличивалась экспрессия гена *STS10* – в 6.2–19.7 раз (рис. 3в).

Таким образом, добавление биопрепаратов на основе эндофитов винограда достоверно активирует экспрессию *PAL* и *STS* – ключевых генов биосинтеза стильбенов в винограде.

*

Изучено влияние биопрепаратов на основе часто встречающихся представителей эндофитных бактерий и грибов дикого винограда *V. amurensis* на рост клеток, содержание и продукцию ресвератрола и его производных в культуре клеток винограда V7. Наибольшее содержание стильбенов, особенно *ε*- и *δ*-виниферина, наблюдалось в культуре клеток *V. amurensis* при добавлении 20 мг биопрепаратов на основе грибов *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. и *Trichoderma* sp. на 50 мл культуры клеток, что коррелировало со значительным увеличением экспрессии большинства анализируемых генов *PAL* и *STS*. Максимальное увеличение общего содержания стильбенов наблюдали при добавлении к культуре клеток винограда V7 10 мг биопрепарата *Trichoderma* sp., при этом наблюдалась самая сильная активация гена *STS7*, отвечающего за сверхпродукцию стильбенов [25]. Общее содержание стильбенов достигало 3.07 мг/г (или 0.3%) сухой биомассы клеток. Это увеличение, по-видимому, связано с активацией биосинтеза олигомеров *транс*-ресвератрола, виниферинов являющейся защитной реакцией как на внедрение бактериальных, так и грибных патогенов [26, 27]. Вещества в составе биопрепаратов, вносимые в культуру клеток винограда, выступают в качестве имитаторов природных эндофитов, вызывая при этом быстрый иммунный ответ растительных клеток.

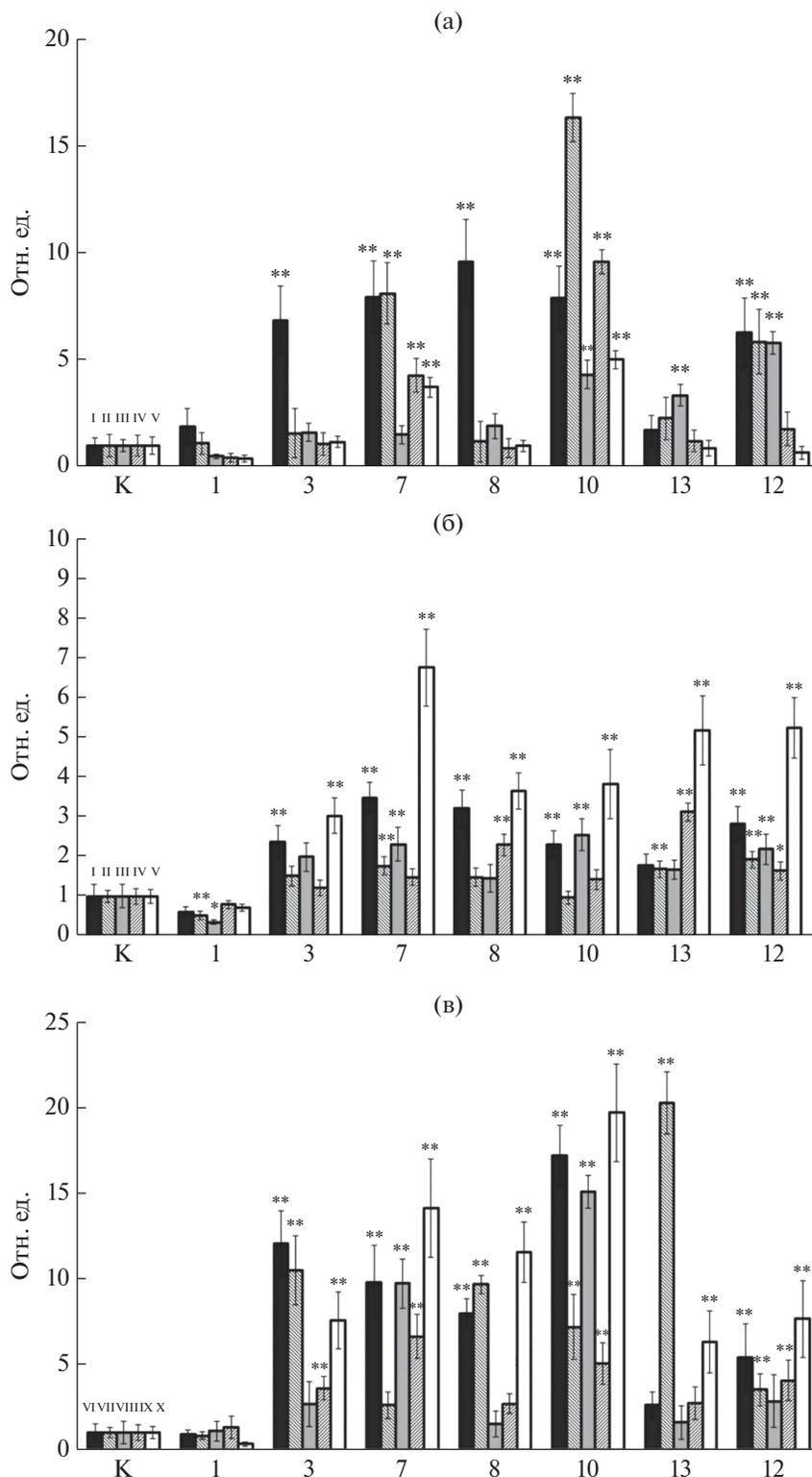


Рис. 3. Уровень экспрессии (отн. ед.) генов *PAL* (а) и *STS* (б, в) в культуре клеток винограда *V. amurensis* V7 после 3 сут культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий: 1 – *Agrobacterium* sp., 3 – *Curtobacterium* sp., 7 – *Xantomonas* sp. и грибами 8 – *Alternaria* sp., 10 – *Cladosporium* sp., 13 – *Trichoderma* sp., и 12 – *Fusarium* sp. К – контроль, культура клеток винограда V7 без биопрепаратов. *PAL1-5*(а) – I–V; *STS1-5*(б) – I–V; *STS6-10*(в) – VI–X соответственно. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для двух связанных выборок: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по сравнению со значениями уровня экспрессии в культуре клеток винограда *V. amurensis* V7.

Важно отметить, что полученный уровень стильбенов после добавления новых биопрепаратов соизмерим с ранее известными активаторами биосинтеза стильбенов в клетках растений *in vitro*. Например, через 18 ч после обработки ультрафиолетовым излучением электромагнитного спектра С (УФ-С) содержание стильбенов в калусных культурах *Arachis hypogaea* достигало 0.017 мг/г сырой или около 0.3 мг/г сухой биомассы [28]. В культуре клеток, которая была обработана патогеном растений *Botryodiplodia theobromae*, содержание стильбенов достигало 0.023 мг/г сырой или около 0.5 мг/г сухой биомассы клеток [29]. В суспензионной культуре клеток *Vitis vinifera* уровень стильбенов составлял 2.1 мг/г сухой биомассы клеток через 2 сут после обработки УФ-С и 100 мкМ метилжасмонатом (MeJa) [30].

Содержание стильбенов в культуре клеток, обработанной биопрепаратами на основе эндофитов винограда было выше, чем в листьях дикорастущего растения винограда до и после УФ-обработки (0.04–0.95 мг/г от сухой биомассы клеток) [20, 31]. Однако содержание стильбенов в экспериментах было ниже, чем при использовании циклических олигосахаридов (циклодекстринов) отдельно или в сочетании с MeJa или некоторыми другими гормонами стресса растений [32, 33]. При использовании этих индуцирующих агентов содержание только *транс*-ресвератрола в культуре клеток *V. vinifera* достигало 35–155 мг/г от сухой биомассы клеток [32, 33].

Стоит отметить, что уровень стильбенов после добавления биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. составил 3.07 мг/г от сухой биомассы клеток в культуре клеток винограда V7, что намного ниже, чем при использовании живых клеток эндофитов. Так при добавлении живых бактерий *Curvobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. к культуре клеток винограда *V. amurensis* приводило к достоверному увеличению содержания стильбенов от 2.2 до 4.5 мг/г сухой биомассы [12]. Добавление живых эндофитных грибов *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp. к культуре клеток винограда также стимулировало биосинтез стильбенов в значительной степени, при этом их содержание достигало от 7.0 до 13.8 мг/г от сухой биомассы [12]. В то же время стимуляция биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи живых эндофитов осложняется тем, что скорость роста бактерий и грибов в значительной мере выше, чем культуры клеток винограда. Использовании живого эндофитного гриба *Trichoderma* sp. для стимуляции биосинтеза стильбенов приводило к увеличению общего содержания стильбенов до 3.9 мг/г [12], а использование биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. до 3.07 мг/г сухой биомассы клеток в культуре клеток винограда V7. Таким образом, использование биопрепарата на основе

Trichoderma sp. для активации биосинтеза стильбенов по эффективности немногим уступает нативному грибу *Trichoderma* sp.

Использование биопрепаратов на основе эндофитов винограда *V. amurensis*, в частности 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp., для стимуляции биосинтеза стильбенов может стать эффективным, дешевым и быстрым способом увеличения продукции ресвератрола.

* * *

Биопрепараты на основе природных эндофитов винограда *V. amurensis* являются новыми природными активаторами биосинтеза стильбенов, которые можно применять для промышленного производства стильбенов в культуре клеток винограда, в частности виниферинов. Наиболее перспективным оказалось применение биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. в концентрации 10 мг на 50 мл культуры клеток винограда, которое увеличивало содержание стильбенов до 3.07 мг/г сухой биомассы клеток и продукцию стильбенов до 6.8 мг/л питательной среды. Разработка и активное применение таких подходов позволит способствовать переходу к высокопродуктивному и экологически чистому сельскому хозяйству.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-74-00002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. // Plant Sci. 2009. V. 177. P. 143–155.
2. Kiselev K.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. P. 417–425.
3. Suwalsky M., Villena F., Gallardo M.J. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2015. V. 1848. P. 76–82.
4. Jeandet P., Douillt-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 2731–2741.
5. Nair D. N. and Padmavathy S. // Hindawi Pub. Corp. The Sci. W. J. 2014. Article ID 250693. <https://doi.org/10.1155/2014/250693>
6. Huang L.H., Yuan M.Q., Ao X.J., Ren A.Y., Zhang H.B., Yang M.Z. // PLoS ONE. 2018. V. 13. № 5. P. e0196996 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196996>
7. Yang M.Z., Huang L.H., Ao X.J., Ren A.Y., Yuan M.Q. and Zhang H.B. // J. Plant Biol. 2018. V. 61. P. 210–216.
8. Ramirez-Suero M., Bénard-Gellon M., Chong J., Laloue H., Stempien E., Abou-Mansour E., et al. // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1417–1426.
9. Yu M., Chen J.C., Qu J.Z., Liu F., Zhou M., Ma Y.M. et al. // Plant Physiol. Biochem. 2020. V. 149. P. 144–152.
10. Chen Q., Diao L., Song H., Zhu X. // Phytomedicine. 2018. V. 49. P. 111–122.

11. Wang Yi., Xin H., Fan P., Zhang J., Liu Y., Dong Y. et al. // The Plant Journal. 2021. V. 105. P. 1495–1506.
12. Aleynova O.A., Suprun A.R., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // Plants. 2021. V. 10. P. 1276. <https://doi.org/10.3390/plants10071276>
13. Reasoner D.J., Geldreich E.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. № 1. P. 1–7.
14. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Karetin Y.A. // Plant Cell Rep. 2015. V. 34. P. 311–320.
15. Lane D.J. 16S/23S rRNA Sequencing/ Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. / E. Stackebrandt, M. Goodfellow. New York, NY, USA: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
16. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Inc.: Acad. Press, 1990. P. 315–322.
17. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Molecul. Biology. 1990. V. 3. P. 403–410.
18. Tyunin A.P., Suprun A.R., Nityagovsky N.N., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2019. V. 136. P. 189–196.
19. Suprun A.R., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Biotechnol. Appl. Biochem. 2020. V. 67. P. 234–239.
20. Kiselev K.V., Aleynova O.A., Grigorchuk V.P.; Dubrovina A.S. // Planta. 2017. V. 245. P. 151–159.
21. Киселев К.В., Шумакова О.А., Маняхин А.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. С. 61–66.
22. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A. // J. Plant Physiol. 2015. V. 185. P. 1–12.
23. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
24. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 5–6. P. 1427–1436.
25. Aleynova O.A., Grigorchuk V.P., Dubrovina A.S., Rybin V.G., Kiselev K.V. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2016. V. 125. P. 329–339.
26. Yadav M.K., Mailar K., Nagarajappa M. J., Chae S.W., Song J.J. and Choi W.J. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 890. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00890>
27. Sundin Ch., Zetterström C.E., DuyVo D., Brkljača R., Urban S., Elofsson M. // Scientific Reports. 2020. V. 10. P. 2103. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58872-0>
28. Ku K.L., Chang P.S., Cheng Y.C., Lien C.Y. // J. Agric. Food. Chem. 2005. V. 53. P. 3877–3881.
29. Yang M.H., Kuo C.H., Hsieh W.C., Ku K.L. // J. Agric. Food. Chem. 2010. V. 58. P. 9537–9541.
30. Xu A., Zhan J.Ch., Huang W.D. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2015. V. 122. P. 197–211.
31. Larronde F., Gaudillère J.P., Krisa S., Decendit A., Deffieux G., Mérillon J.M. // Am. J. Enol. Viti. 2003. V. 54. P. 60–63.
32. Belchí-Navarro S., Almagro L., Sabater-Jara A.B., Fernández-Pérez F., Bru R., Pedreño M.A. // J. Plant. Physiol. 2013. V. 170. P. 258–264.
33. Almagro L., Belchí-Navarro S., Martínez-Marquez A., Bru R., Pedreno M.A. // Plant Physiol. Biochem. 2015. V. 97. P. 361–367.

Activation of Stilbene Biosynthesis in Grape Cell Culture Using Supplements Based of Wild Grapes *Vitis amurensis* Rupr. Endophytes

O. A. Aleynova^{a, *}, N. N. Nityagovsky^a, A. R. Suprun^a, and K. V. Kiselev^a

^a Federal Scientific Center of the Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Biotechnology, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

A new approach is proposed to increase the production and change the qualitative composition of stilbenes – substances valuable for human health, in grape cell culture using 12 biological supplements based on sterile dried biomass of the endophytic bacteria and fungi of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr. Bacteria supplements did not significantly affect the production of stilbenes, while fungi supplements increased the content of stilbenes by 2–3. 5 times. The maximum increase in the stilbenes total content was when adding a biological product based on *Trichoderma* sp., 3.07 mg/g from dry cell biomass. The increase in resveratrol production when using biologics based on *V. amurensis* endophytes in grape cell culture was due to a significant increase in the expression of the stilbene biosynthesis genes – phenyl-alanine ammonia lyase (*PAL*) and stilbene synthase (*STS*). Thus, biological supplements based on natural endophytes of *V. amurensis* is a promising and environmentally friendly stimulator of stilbene content in grape cell culture, which in the future can serve as a good tool in activating the biosynthesis of stilbene on an industrial scale.

Keywords: bacteria, biological supplements, stilbene biosynthesis, fungi, grape cell culture, resveratrol, stilbenes, stilbene synthase (*STS*), phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), endophytes, *Vitis amurensis*

УДК 577.24

ИММОБИЛИЗАЦИЯ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ ОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ХИТОЗАНОВОМ СОРБЕНТЕ ДЛЯ БИОИЗЪЯТИЯ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ИЗ СТОЧНЫХ ВОД

© 2022 г. С. Г. Васильева^{а, *}, Л. Р. Семёнова^а, И. О. Селях^а, О. Б. Чивкунова^а, П. Н. Щербаков^а,
О. И. Баулина^а, О. А. Горелова^а, Е. С. Лобакова^{а, b}

^аБиологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^бИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук, Москва, 127276 Россия

*e-mail: vankat2009@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2021 г.

После доработки 19.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Изучена иммобилизация зеленой микроводоросли (МВ) *Micractinium* sp. NAMSU A-19 с природным комплексом ассоциированных гетеротрофных бактерий в смешанной культуре с цианобактерией (ЦБ) *Synechococcus* sp. 1Dr66E-1 на поликатионном сорбенте на основе природного полимера хитозана. Сорбент, полученный из хитозана с молекулярной массой 600 кДа методом криополимеризации с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента, обладал высоким сродством к поверхностным структурам кислородных фототрофных микроорганизмов (ОФМ) и обеспечивал прочное прикрепление клеток к поверхности сорбента. Изучение кинетики и оценка эффективности иммобилизации клеток смешанной культуры показали высокую сорбционную способность хитозанового сорбента: в течение 1 ч культивирования эффективность иммобилизации составляла в среднем 40–52%, а через 48 ч практически все клетки ОФМ находились в иммобилизованном состоянии. Высокопористый, нетоксичный и биоразлагаемый сорбент обеспечивал надежное прикрепление клеток на протяжении 7 сут культивирования, не препятствовал росту иммобилизованных клеток, как на поверхности, так и во внутренних слоях полимера. Изучение процесса иммобилизации смешанной культуры методом сканирующей электронной микроскопии показало, что клетки ЦБ и МВ с ассоциированными гетеротрофными бактериями плотно прикрепляются к поверхности хитозанового сорбента, при этом наблюдалось образование тяжёлых внеклеточного полимерного матрикса, участвующего в формировании биопленки. Иммобилизация клеток смешанной культуры ОФМ на хитозановом сорбенте была эффективна при очистке воды от нитратов и фосфатов.

Ключевые слова: кислородные фототрофные микроорганизмы, цианобактерии, микроводоросли, иммобилизация, полимерные материалы, сшитые хитозаны, биоизъятие биогенных элементов

DOI: 10.31857/S055510992201010X

Уже более полувека для очистки сточных вод используются кислородные фототрофные микроорганизмы (ОФМ), а именно микроводоросли (МВ) и цианобактерии (ЦБ). Использование ОФМ имеет огромный потенциал из-за высокой скорости поглощения биогенных элементов и способности к деструкции токсичных поллютантов [1]. Известно, что в естественных местообитаниях ОФМ существуют в составе природных сообществ МВ, ЦБ и гетеротрофных бактерий, позволяющих им успешно адаптироваться к неблагоприятным условиям среды, в том числе к избытку или недостатку питательных веществ. Для моделирования природных условий и изучения механизмов взаимодействия ЦБ и МВ в лаборатории используется метод создания смешанных культур, в которых ОФМ

культивируются совместно при различных условиях.

В настоящее время все более распространёнными становятся технологии с применением в процессах очистки сточных вод иммобилизованных ОФМ [2]. Главное преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с использованием суспензионных культур – упрощение сбора биомассы, что является одной из ключевых проблем технологий с участием МВ и ЦБ. Известно также, что иммобилизация позволяет осуществлять культивирование микроорганизмов при большей плотности клеток и более равномерном освещении, по сравнению с суспензионными культурами, что в ряде случаев приводит к увеличению скорости протекания фотосинтеза, потребления соедине-

ний азота и фосфора из сточных вод, а также накоплению клетками ОФМ вторичных метаболитов [1]. Имобилизация клеток микроорганизмов позволяет осуществлять сложные многостадийные процессы, обуславливает лучшую защищенность клеток от воздействия различных отрицательных факторов, в том числе токсичных веществ, содержащихся в сточных водах. Основная сложность при использовании технологий с участием иммобилизованных культур заключается в выборе носителя [3]. Сорбент для иммобилизации ОФМ должен быть недорогим, нетоксичным, не препятствовать поступлению питательных веществ и эффективно освещению клеток, а также обладать высокой сорбирующей способностью [1]. В качестве природных носителей для иммобилизации ОФМ используют субстраты из плодов люфы, сфагнум, торф, полимеры из натуральных полисахаридов (агар-агар, целлюлоза, альгинаты, каррагинан, хитозан), в качестве синтетических носителей – полиакриламид, полиуретан, поливинилхлорид, полипропилен, полисульфон [2]. Биоразлагаемые и биосовместимые сорбенты на основе хитозана являются перспективными носителями для клеток ОФМ [4, 5].

Цель работы – изучение возможности применения сорбентов на основе хитозана для иммобилизации смешанной культуры, состоящей из природного комплекса МВ *Micractinium* sp. NAMSU A-19 и ассоциированных гетеротрофных бактерий, выделенных из эвтрофированной по фосфору среды обитания, и ЦБ *Synechococcus* sp. 1Др66Е-1, выделенных из фрагментов гидроида *Dynatena pumila*.

МЕТОДИКА

Объекты исследования и метод культивирования. В работе использовали альгологическую монокультуру зеленой МВ *Micractinium* sp. NAMSU A-19 (далее в тексте *Micractinium* sp.) с ассоциированными гетеротрофными бактериями, ранее выделенную из водных проб затона озера Большая Имандра в непосредственной близости от хвостохранилища апатит-нефелиновой обогатительной фабрики г. Апатиты (Россия). В качестве прокариотного ОФМ использовали аксеничную культуру ЦБ *Synechococcus* sp. 1Др66Е-1 (далее в тексте *Synechococcus* sp.), выделенную из ассоциации с гидроидным полипом *Dynatena pumila*, собранным на сублиторали Кандалакшского залива Белого моря [6]. Выращивание культур проводили в стеклянных колоннах (600 мл) при постоянном освещении (80 мкмоль квантов ФАР/м²·с), температуре 26°C и продувании стерильного атмосферного воздуха на минеральной среде BG-11 [7] с повышенным содержанием фосфора (г/л): NaNO₃ – 0.74, KNO₃ – 0.9, K₂HPO₄ – 0.181, KH₂PO₄ – 0.089, MgSO₄·7H₂O – 0.075, CaCl₂·2H₂O – 0.036,

лимонная кислота – 0.006, цитрат аммония – 0.006, Na₂ЭДТА·2H₂O – 0.001, Na₂CO₃ – 0.02, раствор микроэлементов – 1 мл) в течение 10–12 сут (до стационарной фазы роста). По окончании культивирования клетки отделяли от среды центрифугированием при 1000 g и ресуспендировали в свежей среде BG-11.

Для иммобилизации использовали сорбент на основе хитозана, полученный в лаборатории полимерных материалов НИЦ “Курчатовский институт”. При синтезе сшитого хитозанового сорбента использовался хитозан ChitoClear HQG 800 (Исландия) с молекулярной массой 600 кДа. 2%-ный водный раствор хитозана перемешивали с 2%-ной уксусной кислотой и добавляли глутаровый альдегид из расчета 1% (в/в) от веса хитозана. Лиофилизация образцов проводилась на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC с глубиной вакуума 0.250 мБар в течение 24 ч, перед извлечением образцы выдерживали в вакууме 0.001 мБар в течение 2 ч [8].

Оценка эффективности иммобилизации смешанной культуры ОФМ на сорбенте на основе хитозана. Иммобилизацию клеток ОФМ на сорбенте проводили в стеклянных колбах объемом 100 мл, содержащих 0.050–0.053 г сорбента в форме диска и 30 мл суспензии культур *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp., предварительно смешанных в соотношении 2 : 1 (об./об.). Перед началом эксперимента определяли общее содержание хлорофилла в смешанной культуре по методике, описанной ранее [9]. Колбы помещали на термостатируемую качалку (120 об./мин, 26°C) и инкубировали в течение 7 сут при освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м²·с. Процесс иммобилизации оценивали по изменению остаточного содержания хлорофилла в суспензии клеток, не прикрепившихся к сорбенту, при инкубации в течение 1, 2, 4, 24, 48, 168 ч. Контролем служила смешанная культура, инкубированная в идентичных условиях, но без хитозанового сорбента.

Эффективность иммобилизации смешанной культуры для каждой длительности инкубации вычисляли по формуле:

$$\mathcal{E}_{\text{им}} = (C_{\text{хл1}} - C_{\text{хл2}}) \times 100\% / C_{\text{хл1}}, \quad (1)$$

где $\mathcal{E}_{\text{им}}$ – эффективность иммобилизации культуры на сорбенте, %; $C_{\text{хл1}}$ – содержание хлорофилла в контроле (без сорбента), мг/л; $C_{\text{хл2}}$ – остаточное содержание хлорофилла в суспензии клеток в присутствии сорбента, мг/л.

Оценка соотношения *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp. в составе смешанной культуры в процессе и по окончании иммобилизации. О соотношении ЦБ и МВ в составе смешанной культуры судили по спектрам поглощения суспензии клеток, вычисляя отношение уровней поглощения в области основных максимумов цианобактериального

фиикоцианина (630 нм) и хлорофилла *a* (680 нм) ЦБ и МВ. По окончании инкубации (через 7 сут), клетки смешанной культуры десорбировали с поверхности носителя путем механического разрушения сорбента и последующего отделения его остатков от клеток смешанной культуры фильтрованием через сетчатый нейлоновый фильтр с диаметром пор 20 мкм. Соотношение величин поглощения при 630 и 680 нм суспензий десорбированной смешанной культуры сравнивали со значениями в контроле.

Изучение особенностей прикрепления клеток смешанной культуры методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Фрагменты сорбента с иммобилизованными на них клетками из смешанной культуры фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида, приготовленного на 0.1 М какодилатном буфере с рН=7.2 в течение 1 ч, затем обезвоживали в водных растворах этанола возрастающей концентрации (от 10 до 100%) и помещали на ночь в 100%-ный ацетон. Образцы высушивали при критической точке на установке “DryerHCP-2” (“Hitachi”, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке “IB-3 IonCoater” (“Eiko”, Япония) и исследовали с помощью сканирующего микроскопа JSM-6380LA (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 15 Кв и инструментальном увеличении 60–20000.

Изучение биоизъятия фосфатов и нитратов иммобилизованными на хитозане клетками смешанной культуры. Суспензии клеток *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp. смешивали в соотношении 2:1 (об./об.). Перед смешиванием плотность суспензий монокультур, определяемая по оптической плотности (ОП) при 680 нм, составляла 0.3 опт. ед. В стеклянные колбы на 250 мл вносили 80 мл суспензии смешанной культуры и 3 образца сорбента массой 0.050–0.053 г в форме диска. Колбы помещали на термостатированную качалку (120 об./мин, 26°C) и инкубировали в течение 8 сут при освещении 40 мкмоль квантов ФАР/м²·с. Контролем служила смешанная культура, которую инкубировали в идентичных условиях, но без хитозанового сорбента. Перед началом эксперимента, а также через 1 и 8 сут отбирали по 3 мл суспензии клеток смешанной культуры, инкубированной с хитозаном и без, затем клетки отделяли от среды центрифугированием при 3000 g. Остаточную концентрацию фосфатов и нитратов в среде оценивали методом ионно-обменной хроматографии на хроматографе Thermo Dionex ICS 1600 HPLC (“Thermo Fisher Scientific Inc”, США) с анионной аналитической колонкой IonPac AS12A.

Статистическая обработка полученных результатов. Представлены результаты двух независимых экспериментов, каждый вариант в трех биологических повторностях. На рисунках представлены

средние значения и соответствующие стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При иммобилизации смешанной культуры через 1 ч после погружения хитозанового диска в суспензию наблюдали снижение содержания хлорофилла в суспензии по сравнению с контролем, указывающее на прикрепление значительной доли клеток ОФМ к поверхности хитозанового диска (рис. 1а). Рассчитанная по формуле (1) эффективность иммобилизации варьировала в пределах 40–52%, что свидетельствовало о высокой сорбционной способности испытываемого сорбента на основе хитозана (рис. 1б). В течение 4 ч культивирования более 70% клеток в суспензии сорбировались на хитозане, однако в дальнейшем скорость иммобилизации клеток снижалась. Через 48 ч практически все клетки находились в иммобилизованном состоянии, а рассчитанная эффективность иммобилизации составила 92–97%. Сравнение эффективности иммобилизации смешанной культуры *Micractinium* sp., *Synechococcus* sp. и исследованной нами ранее монокультуры *Lobosphaera* sp. NAMSU 925/2 [10] показало, что тестируемый сорбент проявлял более высокую способность к сорбции исследованной нами смешанной культуры. Несмотря на окончание процесса иммобилизации в течение 2 сут, инкубация была продолжена до 7 сут для оценки прочности прикрепления клеток, их способности к росту и развитию, а также влияния иммобилизации на соотношение клеток ОФМ в смешанной культуре. Известно, что одним из главных недостатков метода пассивной (адсорбционной) иммобилизации клеток микроорганизмов на поверхности различных природных и синтетических носителей является обратимость процесса [1]. Сорбированные на носителе клетки могут легко освободиться с его поверхности, переходя в суспензию, что затрудняет культивирование и последующий сбор биомассы. Следует отметить, что в эксперименте на протяжении 7 сут мы не наблюдали десорбции клеток смешанной культуры с поверхности полимера, что свидетельствует о существенном преимуществе его использования по сравнению с другими известными носителями [1, 2].

Исследуемый сорбент (рис. 2а) был получен путем сшивания хитозана с молекулярной массой 600 кДа глутаровым альдегидом (рис. 2б) методом криополимеризации [8] и обладал высокопористой структурой. Благодаря наличию значительного количества пор размером от 50 до 200 мкм (рис. 2а), сорбент на основе сшитого хитозана характеризовался большой площадью поверхности, поэтому мог адсорбировать и надежно удерживать значительное количество клеток микроорганизмов (рис. 2г). На первом этапе клетки исследу-

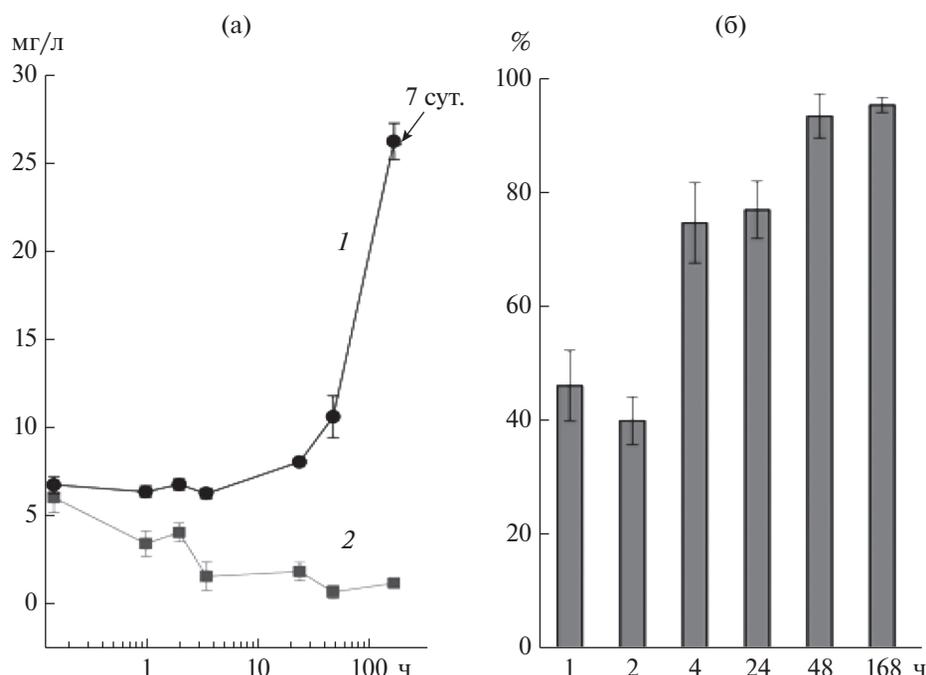


Рис. 1. Кинетика иммобилизации на сорбенте на основе хитозана (а) смешанной культуры *Micractinium* sp. NAMSU A-19 и *Synechococcus* sp. 1Др66Е-1 и ее эффективность (б, %): содержание хлорофилла (мг/л) в контроле ОФМ (1) и ОФМ + хитозан (2).

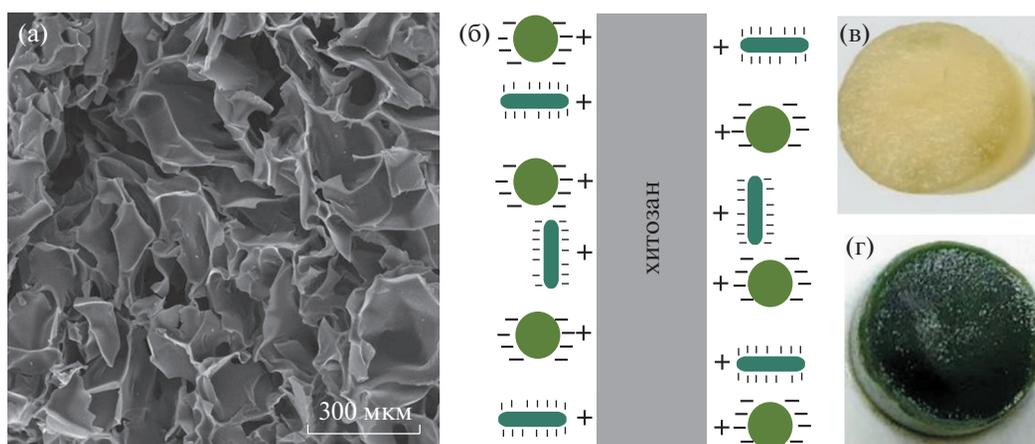


Рис. 2. Микрофотография (СЭМ) поверхности сорбента на основе хитозана (а), схема взаимодействия ЦБ (палочки) и МВ (круги), несущих отрицательно заряженные фосфатные, карбоксильные и тиоловые группы поверхностных клеточных структур, с поверхностью сорбента, несущего положительно заряженные аминогруппы (б), образец сорбента в форме диска до иммобилизации на нем клеток ОФМ (в), образец сорбента после культивирования с клетками ОФМ в течение 7 сут (г).

дуемой смешанной культуры прикреплялись к поверхности пористого сорбента, а затем диффундировали по системе сообщающихся пор во внутренние полости. При этом клетки смешанной культуры сохраняют способность к активному росту и делению, подтверждаемым видимым увеличением количества иммобилизованной биомассы клеток (рис. 2д).

Известно, что сорбент на основе природного поликатионита хитозана обладал высоким сродством к поверхностным структурам клеток ОФМ, так как положительно заряженные аминогруппы на поверхности полимера могут электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами в составе наружной мембраны ЦБ, а также с карбоксильными и тио-

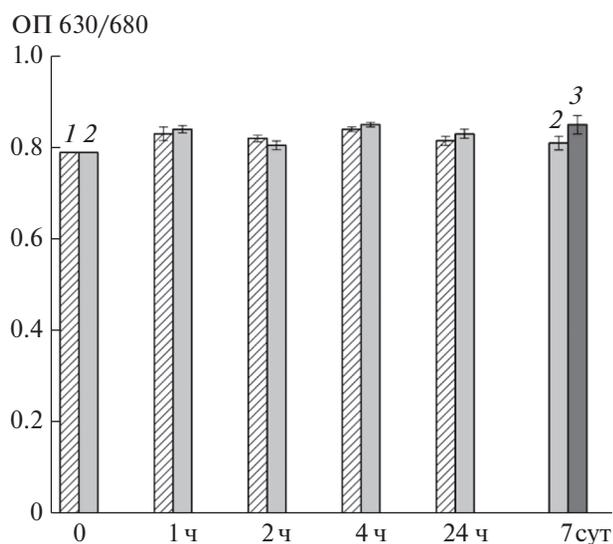


Рис. 3. Отношение (OP_{630}/OP_{680}) максимумов поглощения фикоцианина ЦБ (630 нм) и суммарного хлорофилла *a* МВ и ЦБ (680 нм) в суспензии смешанной культуры, инкубируемой в присутствии сорбента (1) и без него (2, контроль). На 7 сут показано отношение оптической плотности для десорбированной смешанной культуры (3).

ловыми группами полисахаридов, белков и полипептидов, входящими в состав поверхностных структур клеток МВ и ЦБ (рис. 2в) [10, 11]. В водных растворах хитозановые сорбенты были способны к образованию многочисленных межмолекулярных водородных связей, за счет чего прочность связывания их с клеточными стенками микроорганизмов увеличивалась, а комплексы не разрушались даже при экстремальных изменениях рН и ионной силы среды [11].

В ходе иммобилизации проводили оценку соотношения *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp. в суспензии не прикрепившихся к сорбенту клеток и сравнивали с их соотношением в смешанной культуре, инкубированной без носителя. В течение первых 48 ч эксперимента соотношение ОП при максимумах поглощения фикоцианина ЦБ (630 нм) и суммарного хлорофилла *a* МВ и ЦБ (680 нм) в суспензии клеток, не прикрепившихся к сорбенту, и суспензии клеток в контроле значительно не различалась (рис. 3). Следовательно, можно предположить, что клетки МВ и ЦБ сорбировались с одинаковой эффективностью. После 7 сут инкубирования смешанной культуры в присутствии сорбента, соотношение ОП при 630 и 680 нм в суспензии клеток, десорбированных из хитозанового диска, и суспензии клеток в контроле отличалось незначительно, поэтому можно предположить, что иммобилизация на полимере на основе хитозана не оказывала существенного влияния на состав смешанной культуры (рис. 3).

Исследование сорбента с иммобилизованной смешанной культурой проводили с применением метода СЭМ (рис. 4). Одноклеточная ЦБ *Synechococcus* sp. не образовывала слизистых чехлов и была представлена клетками в форме палочек, длиной 1.5–2.0 мкм и диаметром 0.6–0.8 мкм [12], а одноклеточная МВ *Micractinium* sp. – сферическими клетками размером 2–3 мкм. Эти характеристики ОФМ (рис. 4а) соответствуют клеткам МВ и ЦБ на поверхности сорбента. Одновременно выявляются бактерии разных морфотипов (кокки, короткие и длинные палочки разного диаметра), возможно, первоначально ассоциированные с МВ. Как видно на рис. 4а ЦБ и гетеротрофные бактерии прикреплены к сорбенту преимущественно не ориентировано. Однако некоторые клетки ЦБ и большинство тонких длинных палочек бактерий прикрепляются полярным концом клетки перпендикулярно к поверхности сорбента. Одиночные клетки ЦБ, МВ и ассоциированных бактерий, а также их скопления обнаружены на внешней поверхности, в поровых каналах и в складчатых структурах сорбента (рис. 4б).

На поверхности и в поровых каналах полимера на основе хитозана, кроме того, наблюдается формирование внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) в виде тяжей, которые объединяют всех участников иммобилизованного сообщества (рис. 4в). На микрофотографии (рис. 4г) видно, что клетки *Micractinium* sp. и *Synechococcus* sp., активно заселяя поверхность сорбента, образуют на некоторых участках плотный слой агрегированных клеток, в котором представлены оба фототрофных компонента смешанной культуры. Известно, что продукция ВПМ является одним из ключевых этапов в формировании биопленки, образование которой подтверждается наличием крупных смешанных клеточных агрегатов, прикрепленных к поверхности хитозана, каналов, являющихся необходимой частью структуры биопленки (рис. 4г) [13]. Входящие в состав ВПМ компоненты (экзополисахариды, белки, аминокислоты) способствуют увеличению прочности связывания сообществ микроорганизмов с различными твердыми поверхностями [14] благодаря адгезионному взаимодействию. При иммобилизации ОФМ на поликатионном сорбенте на основе хитозана, электростатическое взаимодействие, возникающее между свободными аминокислотными группами на поверхности сорбента и карбоксильными группами кислых полисахаридов, входящих в состав ВПМ, способствует еще более прочному связыванию агрегатов клеток с поверхностью носителя, обеспечивая практически необратимую иммобилизацию.

Наряду с изучением сорбционной эффективности полимера на основе хитозана было исследовано влияние иммобилизации на процесс поглощения биогенных элементов клетками ОФМ. Результаты сравнения эффективности биоизъятия

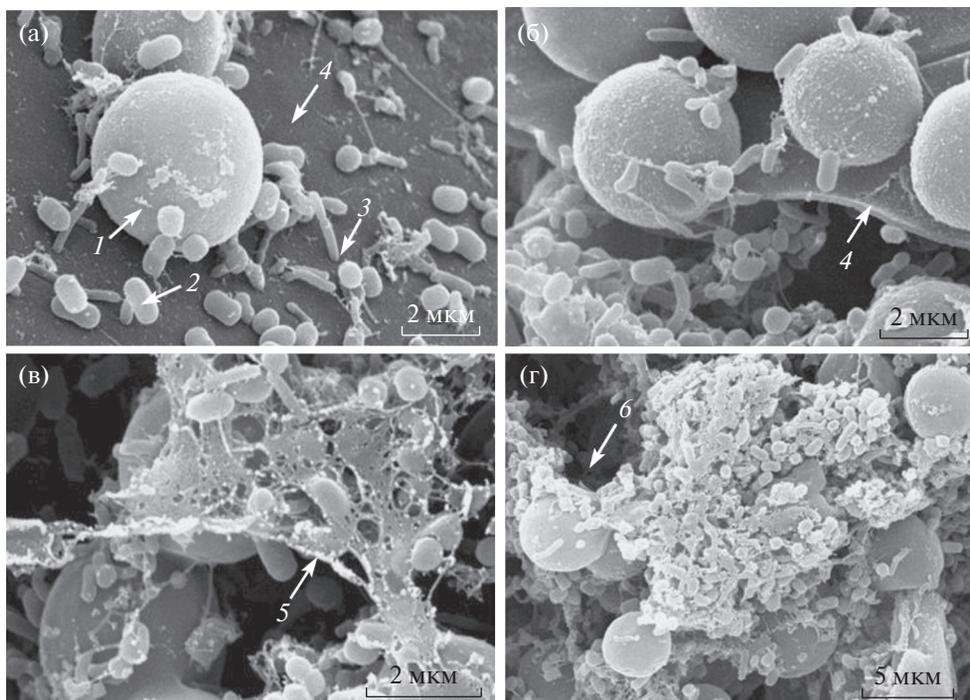


Рис. 4. СЭМ изображения иммобилизованных клеток смешанной культуры ЦБ *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 и МВ *Micractinium* sp. NAMSU A-19 с ассоциированными гетеротрофными бактериями на поверхности хитозанового сорбента (а, б), сопровождаемое образованием полимерного матрикса (в) и биопленки (г): 1 – клетки МВ *Micractinium* sp., 2 – клетки ЦБ *Synechococcus* sp., 3 – клетки гетеротрофной бактерии в форме палочки, прикрепленной апикально к поверхности сорбента, 4 – сорбент на основе хитозана, 5 – тяжи ВПМ, 6 – каналы биопленки, прикрепленной к поверхности сорбента.

нитратов и фосфатов клетками свободной и иммобилизованной на хитозане смешанной культуры *Synechococcus* sp. и *Micractinium* sp. представлены на рис. 5. В 1 сут эксперимента количество, как поглощенных нитратов, так и фосфатов иммобилизованными и свободными клетками смешанной культуры практически не отличалось. В течение следующих 7 сут скорость изъятия биогенных элементов клетками смешанной культуры ЦБ и МВ значительно возросла, при этом эффективность поглощения нитратов и фосфатов у иммобилизованных клеток была выше, чем у свободных. Так после окончания эксперимента клетки смешанной культуры, иммобилизованной на хитозановых дисках, поглотили 189 ± 11 мг/л нитратов и 40 ± 3 мг/л фосфатов, тогда как свободные клетки 150 ± 8 мг/л нитратов и 25 ± 2 мг/л фосфатов.

Увеличение эффективности изъятия биогенных элементов клетками ОФМ, иммобилизованных на различных природных носителях, описано в ряде работ [1, 2, 5, 10] и объясняется увеличением метаболической активности МВ и ЦБ, изменением микроокружения клеток. Известно также, что иммобилизованные культуры более устойчивы к изменениям pH, температуры, ионной силы среды [2, 5]. Основным преимуществом

сшитых хитозановых сорбентов в сравнении с другими природными полимерами является их высокая механическая прочность и эффективность иммобилизации клеток [10]. Одним из перспективных способов применения биodeградируемых, нетоксичных полимеров на основе хитоза-

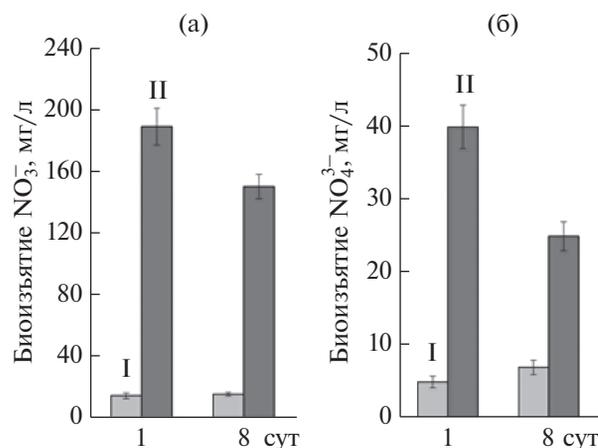


Рис. 5. Биоизъятие нитратов (а) и фосфатов (б) свободными (I) и иммобилизованными клетками (II) смешанной культуры *Micractinium* sp. NAMSU A-19 и *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 при культивировании в модифицированной среде BG-11 в течение 1 и 8 сут.

на является их использование в процессе очистки сточных вод от биогенных элементов, позволяющее получать обогащенную биодоступными формами азота и фосфора биомассу ОФМ и использовать ее в качестве удобрения.

Таким образом, сорбент на основе хитозана с молекулярной массой 600 кДа обладал высокой сорбирующей способностью в отношении смешанной культуры *Synechococcus* sp. и *Micractinium* sp. с ассоциированными гетеротрофными бактериями. Поликатионный сорбент надежно удерживал клетки ОФМ как на поверхности, так и во внутренних слоях полимера, не препятствуя их росту и делению. В течение 7 сут культивирования клетки смешанной культуры практически необратимо прикреплялись к поверхности полимера, при этом наблюдалось формирование ВПМ, который объединяет все компоненты образующейся на носителе биопленки. Имобилизация клеток смешанной культуры ОФМ на хитозановом сорбенте способствует увеличению эффективности биоизъятия нитратов и фосфатов клетками. Таким образом, сорбент на основе хитозана может быть успешно использован для имобилизации ассоциаций и смешанных культур ОФМ с целью применения в различных областях фотобиотехнологии, в том числе для очистки сточных вод и биоизъятия биогенных элементов.

Работа по культивированию ОФМ, изучению методом СЭМ и синтез сорбентов выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-25050) с использованием оборудования ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова и лаборатории полимерных материалов НИЦ “Курчатовский институт”.

Работа по изучению эффективности имобилизации ОФМ выполнена при финансовой поддержке Мегагранта правительства РФ (соглашение № 075-15-2019-1882).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Moreno-Garrido I.* // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. № 10. P. 3949–3964.
2. *De-Bashan L.E., Bashan Y.* // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 6. P. 1611–1627.
3. *Hameed M.S.A., Ebrahim O.H.* // *J. Agric. Biol.* 2007. V. 9. № 1. P. 183–192.
4. *Fierro S., Sanchez-Saavedra M., Copalca C.* // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. P. 1274–1279.
5. *Eroglu E., Agarwal V., Bradshaw M., Chen X., Smith S., Raston S., Iyer K.* // *Green Chem.* 2012. V. 14. P. 2682–2685.
6. *Gorelova O.A., Kosevich I.A., Baulina O.I., Fedorenko T.R., Torshkheeva A.Z., Lobakova E.S.* // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2009. V. 64. P. 16–22.
7. *Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.* // *Bacteriol. Rev.* 1971. V. 35. № 2. P. 171.
8. *Romanova O.A., Grigor'ev T.E., Goncharov M.E., Rudyak S.G., Solov'yova E.V., Krashenninnikov V.P., Saprykin E.V., Sytina S.N., Chvalun M.A., Pal'tsev S.T., Pantelev A.A.* // *B. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 557–566.
9. *Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S.* // *J. Phycol.* 2010. V. 46. № 4. P. 763–772.
10. *Vasilieva S., Lobakova E., Grigoriev T., Selyakh I., Semenova L., Chivkunova O., Gotovtsev P., Antipova C., Zagoskin Y., Scherbakov P., Lukyanov A., Lukanina K., Solovchenko A.* // *J. Water Process Eng.* 2021. V. 40. P. 101774.
11. *Синицын А., Райнина Е., Лозинский В., Снасов С.* Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Издательство МГУ, 1994. 288 с.
12. *Koksharova O.A., Kravzova T.R., Lazebnaya I.V., Gorelova O.A., Baulina O.I., Lazebny O.E., Fedorenko T.A., Lobakova E.S.* // *BioMed Research International.* 2013. V. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/760681>
13. *Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К.* // *Микробиол.* 2015. V. 84. № 6. P. 623–644.
14. *Tosteson T.R., Revuelta R., Zaidi B.R., Imam S.H., Bard R.F.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1985. V. 104. № 1. P. 60–71.

Immobilization of a Mixed Culture of Oxygenic Phototrophic Microorganisms on a Chitosan-Based Sorbent for Nutrient Bioremoval

S. G. Vasilieva^{1, *}, L. R. Semenova¹, I. O. Selyakh¹, O. B. Chivkunova¹, P. N. Shcherbakov¹, O. I. Baulina¹, O. A. Gorelova¹, and E. S. Lobakova^{1, 2}

¹ *Biological Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

² *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

*e-mail: vankat2009@mail.ru

The immobilization of cells of a mixed culture of microalgae (MB) *Micractinium* sp. NAMSU A-19 and cyanobacteria (CB) *Synechococcus* sp. 1Dp66E-1 on chitosan-based polymer was studied. The polycationic sorbent based on a natural chitosan polymer with a molecular weight of 600 kDa, obtained by crosslinking chitosan with glutaraldehyde by cryopolymerization, has a high affinity for the surface structures of oxygenic phototrophic microorganisms (OPM) and provides a strong attachment of cells to the surface of the sorbent. The study of the kinetics and evaluation of the effectiveness of mixed culture immobilization showed a high

sorption capacity of the chitosan sorbent, as during the 1st hour of cultivation the immobilization efficiency was on average 40–52%, and after 48 h, almost all cells were immobilized. The highly porous, non-toxic and biodegradable sorbent provided steady cell attachment during 7 days of cultivation, and did not affect the growth of immobilized mixed culture, both on the surface and in the inner layers of the polymer. The study of mixed culture immobilization by scanning electron microscopy showed that CB and MB cells are tightly attached to the surface of the chitosan sorbent, followed by formation of strands of the extracellular polymer matrix and biofilm, consisting of cells of the mixed culture of MB and CB, as well as heterotrophic bacteria associated with *Micractinium* sp. Immobilization on a chitosan sorbent contributes the increasing of nitrates and phosphates bioremoval by tested mixed culture.

Keywords: oxygenic phototrophic microorganisms, cyanobacteria, microalgae, immobilization, polymer materials, cross-linked chitosan, nutrient bioremoval

УДК 581.19+577.114

ПАРАМЕТРЫ РОСТА И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ В ПРОРОСТКАХ ОГУРЦА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОНЪЮГАТОВ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

© 2022 г. Е. Л. Недвед¹, *, Ж. Н. Калацкая¹, И. А. Овчинников¹,
Е. И. Рыбинская¹, А. Н. Красковский², В. В. Николайчук², К. С. Гилевская²,
В. И. Куликовская², В. Е. Агабеков², Н. А. Ламан¹

¹Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

²Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

*e-mail: nedved_e@tut.by

Поступила в редакцию 25.02.2021 г.

После доработки 19.05.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Синтезированы конъюгаты хитозана с кофейной и феруловой кислотами с соотношением хитозан : кислота 5 : 1 с помощью модифицированного карбодиимидного метода, позволяющего регулировать степень пришивки кислот от 0.5 до 3.4%. Изучена биологическая активность полученных конъюгатов на примере 7-дневных проростков огурца (*Cucumis sativus* L.). Отмечен значительный ростстимулирующий эффект обработки семян конъюгатами в бесстрессовых условиях выращивания проростков при отсутствии изменений антиоксидантного статуса по сравнению с контрольными растениями. Установлено координационное действие конъюгатов на рост органов проростков в разных условиях выращивания, проявляющееся в увеличении отношения длины корней к длине побега. Обсуждены возможные механизмы ослабления действия длительного натрий-хлоридного засоления при обработке семян конъюгатами с оксикоричными кислотами за счет снижения в семядолях проростков интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), стабилизации уровня пролина и повышения общей пероксидазной активности.

Ключевые слова: огурец (*Cucumis sativus* L.), солевой стресс, конъюгаты, хитозан, оксикоричные кислоты, морфометрические показатели, пролин, перекисное окисление липидов, антиоксидантная активность

DOI: 10.31857/S0555109922010068

Проблема увеличения и сохранения устойчивости растений к действию стрессовых факторов за счет активации их защитных механизмов остается актуальной [1, 2]. Одним из возможных путей решения данной проблемы является разработка новых форм экологически безопасных биodeградируемых пленкообразующих препаратов для обработки семян, сочетающих биополимерную матрицу и активное соединение в качестве структурного фрагмента полимеров.

В качестве полимерной основы наибольший интерес вызывает хитозан — гетерополимер N-ацетилглюкозамина и глюкозамина, обладающий уникальными физико-химическими свойствами, биоцидной активностью, биосовместимостью и биodeградируемостью [3]. Оксикоричные кислоты, как и большинство фенольных соединений, вызывают защитные ответные реакции у растений. В последнее время отмечается активное применение

экзогенных оксикоричных кислот в качестве индукторов устойчивости и регуляторов роста растений. Согласно литературным данным [4, 5] оксикоричные кислоты, в частности, кофейная (КК) и феруловая (ФК), оказывали стимулирующее действие на рост и развитие растений. Предобработка КК оказывала положительный эффект на растения сои в условиях солевого стресса [6, 7]. В работе [8] отмечается, что экзогенная КК в концентрации 0.1 мМ участвует в регуляции ряда физиолого-биохимических процессов, которые во многом определяют продуктивность растений картофеля. Обработка рассады огурца 25 мкМ КК стимулирует накопление свободных сахаров, что свидетельствует о формировании адаптационных реакций у растений в условиях гипотермического стресса [9].

Возможность создания композиций хитозана с оксикоричными кислотами может обеспечить

множественный эффект – защитные свойства при покрытии семян пленкой, стимуляция ростовых процессов, фунгистатический эффект, индуцирование защитных свойств растений по отношению к биотическим и абиотическим стрессам.

Цель данной работы – оценка влияния синтезированных конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами при обработке ими семян на физиолого-биохимические показатели растений огурца в условиях выращивания без стресса и при действии солевого стресса.

МЕТОДИКА

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили проростки огурца (*Cucumis sativus* L.), сорт Малышок. Семена растений обрабатывали в стеклянной колбе путем их механического перемешивания в 1%-ном водном растворе конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами в объеме 140 мкл на 3 г семян до равномерного распределения раствора по поверхности семян. Затем семена выдерживали при комнатной температуре в течение 24 ч. Контролем служили необработанные семена. Обработанные и контрольные семена перед закладкой опыта имели одинаковую исходную влажность.

Для синтеза конъюгатов использовали хитозан с $M_v \sim 30$ кДа, степенью деацетилирования 98.3%, “Glentham Life Sciences” (Великобритания), ФК ($M = 194.18$ г/моль) и КК ($M = 180.16$ г/моль, “Sigma-Aldrich”, США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодииимид гидрохлорид (EDC, “Sigma-Aldrich”).

Проростки огурца выращивали рулонным способом [10] до 7-дневного возраста в условиях искусственного освещения с интенсивностью 4 тыс. люкс, фотопериод: 14 ч – свет, 10 ч – темнота. Длительный солевой стресс создавали, помещая рулоны с семенами в 100 мМ раствор хлорида натрия на весь период выращивания. В условиях отсутствия стресса растения выращивали на дистиллированной воде. Для биохимических исследований использовали семядольные листья.

Содержание пролина определяли согласно методу [11], в основе которого лежит способность нингидрина связываться с пролином с образованием продукта розового цвета. Навеску семядольных листьев (0.3 г) растирали в 3%-ной сульфосалициловой кислоте и центрифугировали 15 мин при 12000 г. К аликвоте супернатанта приливали ледяную уксусную кислоту и нингидриновый реактив в соотношении 1 : 1 : 1, нагревали в течение 60 мин при 90°C на термошейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин). Оптическую плотность измеряли на спектрофото-

метре “Jasko V-630” (Япония) при длине волны 515 нм.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрическим методом, основанным на образовании окрашенного комплекса малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при нагревании (ТБК-продукты). Навеску семядольных листьев (0.1 г) растирали в 2 мл 0.25%-ной ТБК, растворенной в 10%-ной трихлоруксусной кислоте. Реакцию с образованием окрашенного комплекса проводили в течение 30 мин при 95°C на термошейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин), после чего пробы охлаждали и центрифугировали 15 мин при 12000 г. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре “Jasko V-630” (Япония) при длине волны 532 и 600 нм [12].

Для оценки активности общей пероксидазы (КФ 1.11.1.7) семядольные листья (0.2 г) растирали на холоду в 0.2 М Na-ацетатном буфере (pH 5.0), содержащем 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид, затем центрифугировали 20 мин при 12000 г и температуре 4°C. Активность фермента определяли по методу, основанному на измерении оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении бензидина за определенный промежуток времени [13]. Реакционная смесь содержала: супернатант, 0.2 М Na-ацетатный буфер (pH 5.0), 0.01%-ный уксуснокислый бензидин, 0.3%-ный пероксид водорода. Оптическую плотность измеряли при длине волны 590 нм на спектрофотометре “Jasko V-630” (Япония) [13].

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1) семядольные листья (0.2 г) растирали на холоду в К, Na-фосфатном буфере (pH 7.8), содержащем 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид, центрифугировали 20 мин при 12000 г и температуре 4°C. Общую активность СОД определяли согласно методу [14]. Реакционная смесь содержала супернатант, 0.05%-ный нитросиний тетразолий, 39 мкМ L-метионин, 0.24%-ный трилон-Б, 0.025%-ный рибофлавин. Реакцию проводили при освещении люминесцентными лампами ($I = 2350$ Lm) в течение 15 мин. Поглощение раствора измеряли при 560 нм на спектрофотометре “Jasko V-630” (Япония) [14].

Концентрацию белка в полученных ферментных препаратах оценивали по методу Бредфорда.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием общепринятых методов [15]. На диаграммах приведены средние значения показателей с указанием стандартной ошибки средней, надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по критерию Стьюдента при $p \leq 0.05$; а – различия достоверны относительно бесстрессового кон-

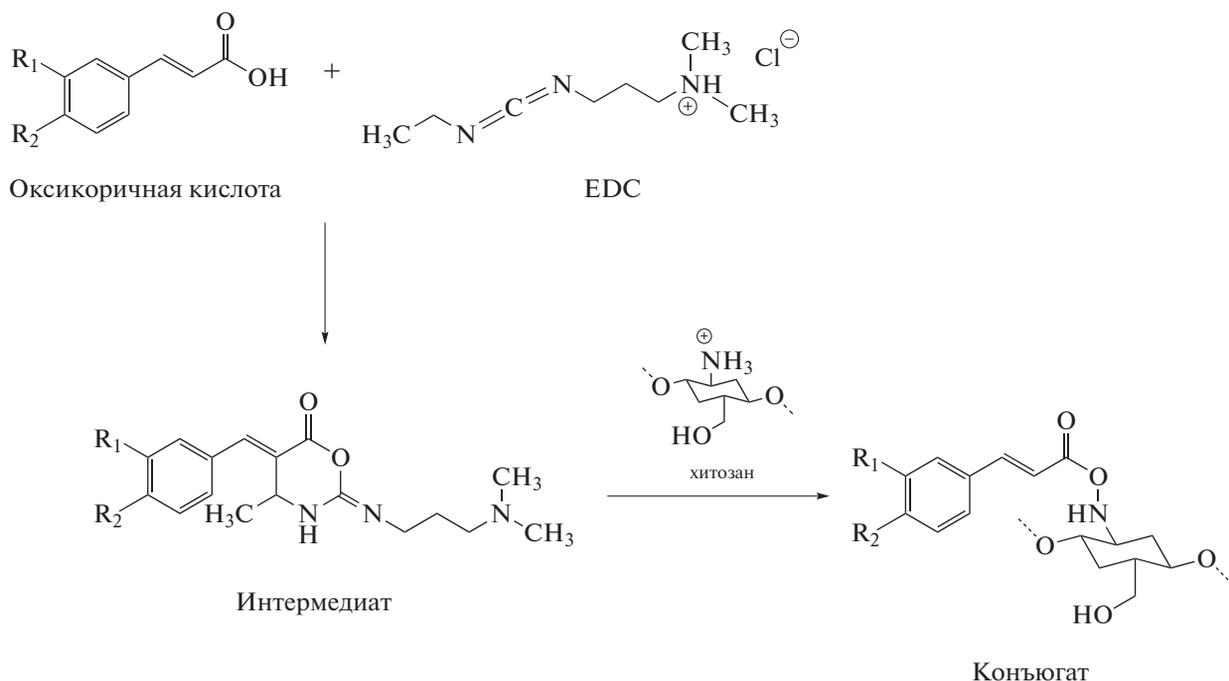


Рис. 1. Схема получения конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами карбодиимидным способом ($R_1=OH$, $R_2=H$ — кофейная кислота; $R_1=OCH_3$, $R_2=H$ — феруловая кислота).

троля, б — различия достоверны относительно стрессового контроля.

Получение конъюгатов. Синтез конъюгатов хитозана с молекулярной массой 30 кДа и ФК и КК в концентрации 10 мкМ проводили на основании предварительно полученных данных о влиянии хитозанов с различной молекулярной массой, оксикоричных кислот в диапазоне концентраций 0.1–100 мкМ, а также их смесей на прорастание семян и биометрические показатели растений огурца в лабораторных условиях. Конъюгаты хитозана с оксикоричными кислотами получали карбодиимидным методом с предварительной активацией карбоксильных групп кислоты EDC (рис. 1) по методике, описанной в работе [16]. ФК или КК (5 мг/мл) и EDC растворяли в диметилсульфоксиде. При этом EDC брали в трехкратном мольном избытке по отношению к оксикоричным кислотам. Раствор кислоты по каплям добавляли к раствору EDC и перемешивали на магнитной мешалке в темноте 1 ч. Далее полученный раствор, содержащий активированную кислоту, по каплям добавляли к раствору хитозана (5 мг/мл) в 0.5%-ной уксусной кислоте при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, затем выдерживали 20 ч в темноте при комнатной температуре. Синтезированный конъюгат хитозана с ФК (или КК) очищали от реакционной смеси диализом в целлюлозных диализных трубках, размер пор 14 кДа, (Sigma D9277-100FT и D9652-100FT) против воды в течение 1 сут. В про-

цессе синтеза массовое соотношение хитозан: ФК (КК) составило 5:1. Содержание оксикоричных кислот в синтезированных конъюгатах определяли спектрофотометрически как описано в работе [16]. Для этого снимали спектр поглощения конъюгата в области 200–400 нм и рассчитывали количество кислоты по предварительно построенному калибровочному графику. Степень пришивки ФК (КФК) к хитозану (CR, %) рассчитывали по формуле:

$$CR = n_k / n_{NH_2} \times 100\%,$$

где n_k — количество ФК (КК) в конъюгате, моль; n_{NH_2} — количество мономерных звеньев хитозана, содержащих аминогруппы, моль.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценивали влияние синтезированных конъюгатов хитозан: ФК (Х-ФК) и хитозан: КК (Х-КК) на биометрические показатели 7-дневных проростков огурца в бесстрессовых и стрессовых (100 мМ NaCl) условиях. Внешний вид растений представлен на рис. 2.

В отсутствии стресса обработка семян конъюгатами приводила к увеличению длины и массы проростков. Так, в варианте Х-ФК длина и масса корней превышала контроль на 44 и 28% соответственно (рис. 3а, 3в). При обработке семян Х-КК возрастали все показатели относительно бесстрессового контроля: длина корней — на 64%,



Рис. 2. Внешний вид проростков огурца, выращенных в бесстрессовых и стрессовых условиях при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами: 1 – контроль, H_2O , 2 – контроль, 100 мМ NaCl, 3 – X-ФК, H_2O , 4 – X-ФК, 100 мМ NaCl, 5 – X-КК, H_2O , 6 – X-КК, 100 мМ NaCl.

длина побега – на 20%, масса корней – на 62%, масса побега – на 29% (рис. 3).

В условиях действия солевого стресса регистрировали значительное угнетение роста по сравнению с обычными условиями. Длительное засоление (100 мМ NaCl) приводило к снижению длины корней и побега в среднем на 34 и 31%, сырая масса корней и побега уменьшалась на 28 и 36% соответственно. При этом не наблюдалось достоверно значимых различий между контролем в стрессовых условиях и опытными вариантами по биометрическим показателям (рис. 3).

Отношение длины корней к длине побега увеличивалось в вариантах обработки X-ФК и X-КК на 34 и 10% соответственно относительно контрольных растений, находящихся в стрессовых условиях (рис.4).

Таким образом, выявлен значительный рост-стимулирующий эффект обработки семян конъюгатами на основе хитозана и оксикоричных кислот при выращивании растений огурца без стресса. При этом отмечено изменение соотношения развития надземной и подземной частей проростка в сторону увеличения корневой системы.

Механизмы влияния на растения получаемых в настоящее время конъюгатов на основе хитозана и оксикоричных кислот только начинают изучаться. Однако согласно литературным данным оксикоричные кислоты в низких концентрациях стимулируют корнеобразование в результате предотвращения декарбоксилирования индол-3-уксусной кислоты (ИУК) [5, 17]. Также показано, что феру-

ловая и кофейная кислоты, имеющие гидроксил в пара- положении, проявляют более эффективный антагонистический эффект в отношении абсцизовой кислоты в сравнении с коричной кислотой [17].

Отмечено стимулирующее действие средне- и высокомолекулярных хитозанов на высоту, количество побегов и листьев у *Freesia Eckl. ex Klatt*. [18]. Исследования Ли с соавт. [19] показали положительное влияние хитозана на проростки сои, при этом эффективность действия хитозана была прямо пропорциональна молекулярной массе. Авторы, предположили, что замачивание семян в растворе хитозана с высокой молекулярной массой (>1000 кДа) оказывало благоприятное влияние на рост проростков сои. С другой стороны, в исследованиях Луан с соавт. [20] стимулирующий эффект проявлял низкомолекулярный хитозан (16 кДа). Используемый в работе хитозан с молекулярной массой 30 кДа оказывал стимулирующее действие, увеличивая длину корней у проростков огурца в условиях без стресса. Однако наибольший эффект на рост и накопление биомассы наблюдали при совместном применении хитозана с оксикоричными кислотами [21]. На основании полученных результатов синтезировали исследуемые в работе конъюгаты.

В условиях длительного солевого стресса не отмечено активации роста проростков при применении конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами, однако увеличенное отношение длины корня к длине побега сохранялось, что может свидетельствовать об улучшении водопоглощаю-

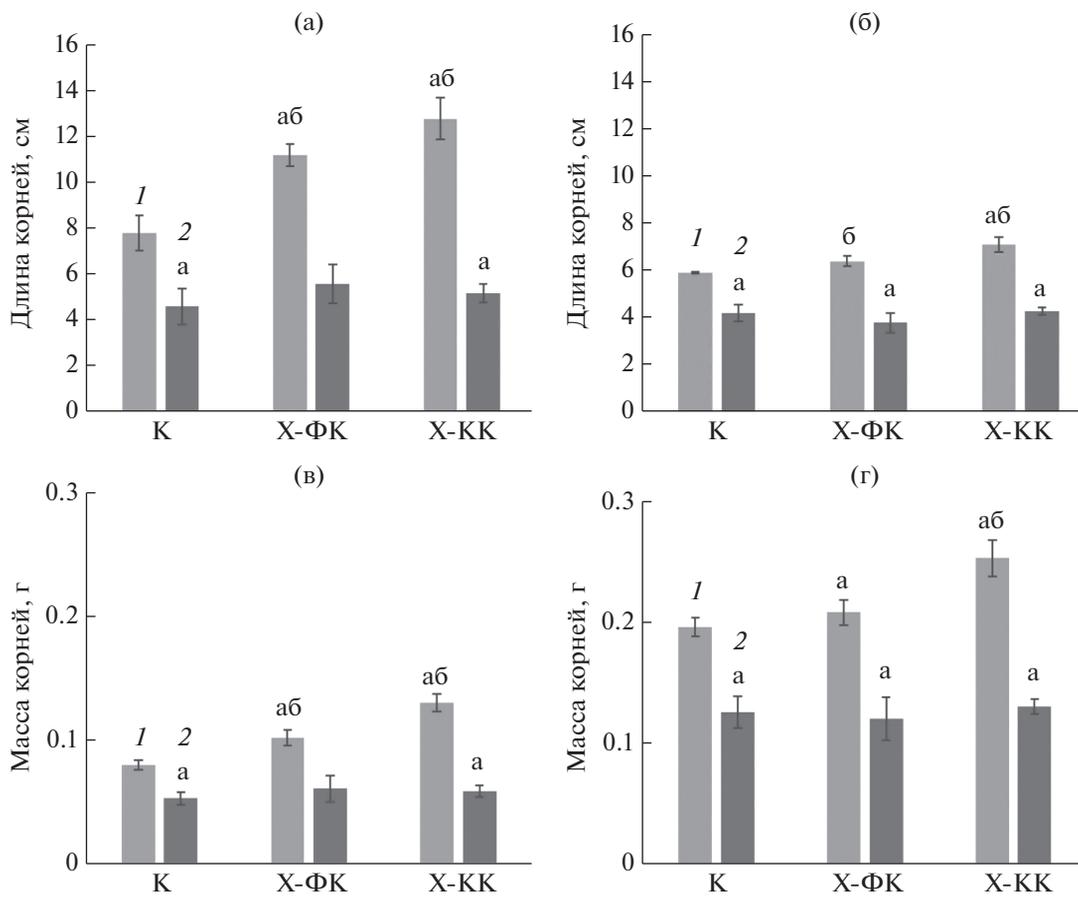


Рис. 3. Длина и масса корней (а, в) и побегов (б, г) 7-дневных проростков огурца, выращенных в бесстрессовых (1) и стрессовых условиях (2, 100 мМ NaCl) при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами.

шей способности корневой системы, предотвращающей накопление токсичных ионов и перемещение их в надземные органы, и повышении жизнеспособности проростков [22].

Накопление пролина является одной из наиболее быстрых ответных реакций клетки, а его содержание может также быть важным показателем состояния растений при действии солевого стресса [22, 23]. Кроме осмопротекторных свойств пролин регулирует кислотность цитозоля и поддерживает соотношение НАД⁺/НАДН, усиливает фотохимическую активность фотосистемы II в мембранах тилакоидов и снижает ПОЛ [24]. Дополнительный синтез этой аминокислоты повышает общую устойчивость растений к абиотическим стрессам, так как пролин защищает мембраны, макромолекулы и структурные элементы клетки, приводя, таким образом, к повышению неспецифической устойчивости. Анализируется возможность рассматривать пролин в качестве метаболического сигнала, регулирующего окислительно-восстановительный гомеостаз и экспрессию некоторых генов стрессового ответа [25–27].

Анализ содержания пролина в 7-дневных проростках огурца показал существенное увеличение его уровня при действии солевого стресса. Содерж-

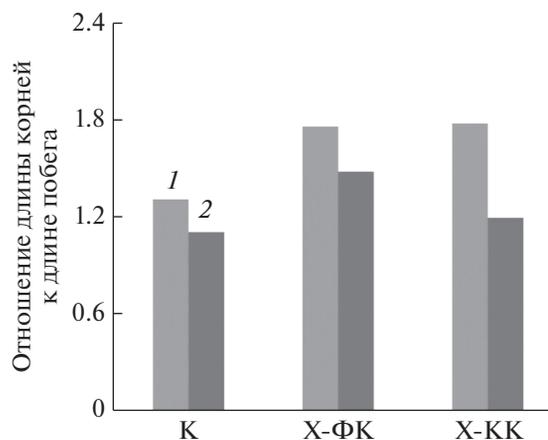


Рис. 4. Отношение длины корней к длине побега 7-дневных проростков огурца, выращенных в бесстрессовых (1) и стрессовых условиях (2, 100 мМ NaCl) при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами.

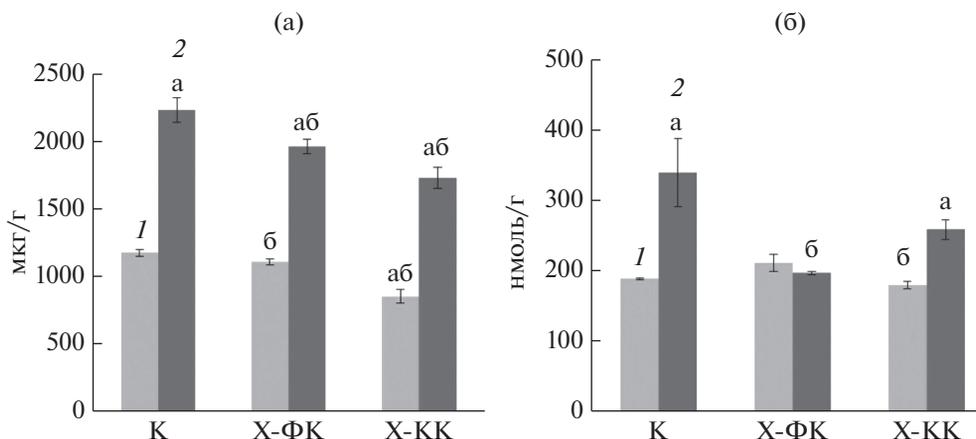


Рис. 5. Содержание пролина (а) и ТБК-продуктов (б) в 7-дневных проростках огурца, выращенных в бесстрессовых (1) и стрессовых условиях (2, 100 мМ NaCl) при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами.

жание пролина у контрольных растений было 2225.6 ± 88.9 мкг/г сухой массы, в 2 раза выше аналогичного показателя у растений в отсутствие стрессового фактора. Обработка семян Х-КК в условиях выращивания без стресса приводила к снижению содержания пролина в семядольных листьях проростков на 27% относительно контроля. В вариантах обработки Х-ФК и Х-КК содержание пролина в условиях солевого стресса было ниже относительно стрессового контроля на 12 и 23% соответственно (рис. 5а).

Уменьшение накопления пролина, вероятно, свидетельствует о том, что обработка семян конъюгатами хитозана способствовала снижению степени повреждения семядолей огурца хлористым натрием. Похожие результаты о снижении накопления пролина при солевом стрессе были получены при обработке 24-эпибрассинолидом растений проса [28] и перца [29], а также при обработке мио-инозитолом перца в условиях засухи [30].

Одним из последствий действия засоления на растения является окислительный стресс, связанный, прежде всего, с нарушениями процессов фотосинтеза и дыхания [31]. В условиях действия солевого стресса происходит связанное с падением устьичной проводимости ингибирование фотосинтеза и снижение активности фотосистемы II. При этом нарушается функционирование электронтранспортной цепи в хлоропластах, что вызывает усиление образования АФК, таких как синглетный кислород, супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и др. [32], что приводит к активации ПОЛ [33, 34]. Также считается, что причиной повышения уровня АФК в клетках при солевом стрессе непосредственно может быть дефицит воды, нарушающий гидратацию и функционирование биомакромолекул [35].

В условиях действия стрессового фактора в семядольных листьях проростков контрольного ва-

рианта отмечалось увеличение содержания ТБК-продуктов в 1.8 раза относительно растений, выращенных на воде. Тогда как интенсивность ПОЛ в семядолях проростков из обработанных конъюгатами семян была существенно ниже при солевом стрессе по сравнению со стрессовым контролем. Наблюдалось снижение содержания ТБК-продуктов на 42% при обработке Х-ФК и на 24% при обработке Х-КК (рис. 5б).

Значительная индуцируемая NaCl интенсивность процессов ПОЛ, о чем свидетельствует возрастание количества ТБК-продуктов, является маркером развивающегося в растениях огурца стресса, уровень которого значительно ниже при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами.

При стресс-зависимой генерации АФК в клетке происходит изменение активности антиоксидантных ферментов и метаболизма низкомолекулярных протекторных соединений. В настоящее время не вызывает сомнений большое значение антиоксидантной системы в формировании солеустойчивости растений [35, 36]. Во многих работах, выполненных на контрастных по устойчивости растениях, показана корреляция между активностью антиоксидантных ферментов и резистентностью к действию засоления [37, 38], хотя она не является однозначной. Как полифункциональные ферменты неспецифические пероксидазы задействованы и в адаптации растений к засолению. Установлено повышение их активности при краткосрочном воздействии солевого стресса [39], а также показана более высокая активность неспецифической пероксидазы у солеустойчивых растений при засолении по сравнению с неустойчивыми [37].

При действии солевого стресса наблюдали увеличение активности пероксидазы в 1.8 раза в контрольных растениях, в 2.4 в варианте Х-ФК и 3 раза в варианте К-КК относительно растений в

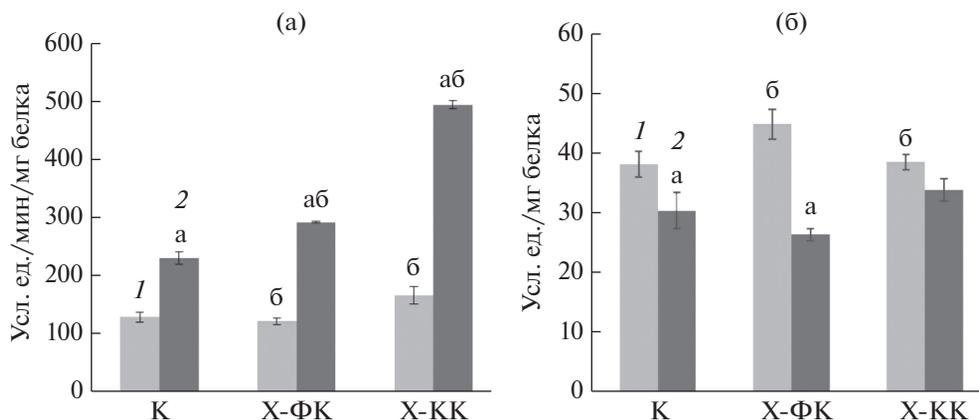


Рис. 6. Активность пероксидазы (а) и СОД (б) в 7-дневных проростках огурца, выращенных в бесстрессовых (1) и стрессовых условиях (2, 100 мМ NaCl) при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами.

условиях выращивания без стресса. При этом значительное повышение активности фермента (в 2 раза) относительно стрессового контроля в условиях засоления отмечалось при обработке семян конъюгатами Х-КК (рис. 6а). Возрастание активности этого антиоксидантного фермента в растениях огурца при засолении из опытных вариантов сопровождалось снижением интенсивности ПОЛ.

Активность СОД снижалась при действии солевого стресса в среднем на 20% при обработке семян конъюгатами относительно бесстрессового контроля. Достоверно значимых различий активности фермента между вариантами как в отсутствии стресса, так и в стрессовых условиях не наблюдалось (рис. 6б).

При действии неблагоприятных факторов активность СОД может изменяться разнонаправленно. Имеющиеся литературные данные показывают существование взаимосвязи между активностью СОД и устойчивостью растений к действию стрессоров. Так, у солетолерантного сорта сафлора (*Carthamus tinctorius* L.) активность СОД при солевом стрессе была выше, чем у чувствительного [37]. Такую же зависимость между активностью СОД и солеустойчивостью выявили у различных генотипов гороха [38]. Значительное увеличение активности СОД при действии засоления установлено у солеустойчивых сортов томата [40]. Однако при увеличении длительности действия стрессора или его интенсивности происходившая в начале активация СОД снижалась в условиях генерации АФК [41]. Наблюдаемое в настоящей работе снижение активности СОД на 7 сут действия солевого стресса могло быть вызвано длительным воздействием NaCl на проростки.

В литературных источниках сообщалось о роли экзогенных оксикоричных кислот [6, 42, 43] и хитозанов [44] в ослаблении неблагоприятного

воздействия стресса на растения, в том числе в результате изменения функционирования антиоксидантной системы растений.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в условиях выращивания без стресса обработка семян конъюгатами хитозана с ФК и КК оказывала ростстимулирующий эффект на проростки, в том числе, координируя рост органов, увеличивая отношение длины корней к надземной части. При этом не наблюдалось значительных изменений антиоксидантного статуса относительно контрольных растений. В связи с чем, можно предположить, что синтезированные конъюгаты эффективны в качестве регуляторов роста в отсутствии стрессового воздействия.

В условиях длительного засоления при обработке семян конъюгатами не выявлено изменений по длине и биомассе проростков огурца по сравнению с контрольными растениями, однако сохранялось увеличенное отношение длины корней к длине побегов. При этом в тканях семядолей не отмечено значительной аккумуляции пролина, но выявлено снижение интенсивности процессов ПОЛ на фоне высокой общей пероксидазной активности. Можно предположить, что полученные конъюгаты хитозана с ФК и КК способны повышать устойчивость проростков к длительному натрий-хлоридному засолению в результате снижения интенсивности окислительных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных исследований, грант № Б19-020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколов Ю.А. Элиситоры и их применение в растениеводстве. / Ред. Т.С. Климовича. Минск: Белорусская наука, 2016. 201 с.

2. *Pedrini, S., Merritt D. J., Kingsley J.S.* // Trends Plant Sci. 2017. V. 22. № 2. P. 106–116.
3. *Тютчев С.Л.* Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. Санкт-Петербург: ВИЗР, 2014. 212 с.
4. *Li H.H., Inoue M., Nishimura H., Mizutani J., Tsuzuki E.* // J.Chem. Ecol. 1993. V. 19. № 8. P. 1775–1787.
5. *El-Awadi M.E., Dawood M.G., Abdel-Baky Y.R., El-Rokiek K.G.* // AgricEngInt: CIGR J. 2017. № 2. P. 53–60.
6. *Klein A., Keyster M., Ludidi N.* // Acta Physiologia Plantarum. 2013. V. 35. № 10. P. 3059–3066.
7. *Klein A., Keyster M., Ludidi N.* // Journal of Botany. 2015. V. 96. № 1. P. 13–18.
8. *Puzina T.* // Advances in Engineering Rescorch. 2008. V. 151. P. 584–588.
9. *Wan Y.Y., Zhang Y., Zhang L., Zhou Z.Q., Li X., Shi Q., Wang X., Bai J.* // Acta Physiologiae Plantarum. 2015. V. 37. № 61. P. 1706.
10. *Кабашишникова Л.Ф.* Способ ранней диагностики эффективности многокомпонентных капсулирующих составов для обработки семян. Методические указания. Минск: Право и экономика, 2003. 31 с.
11. *Шухалева Г.Н.* // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Серия: биология. 2014. Т. 21. № 1112. С. 168–72.
12. *De Vos C.H.R.* // J. Plant Physiol. 1989. V. 135. № 3. P. 164–169.
13. *Бояркин А.Н.* Определение активности пероксидазы. / Ред. А.И. Ермакова Ленинград: Колос, 1987. С. 41–43.
14. *Beyer W.F., Fridovich I.* // Anal. Biochem. 1987. V. 161. № 2. P. 559–566.
15. *Grantz S.A.* Primer of Biostatistics / Ed S. Grantz. 7th Ed. N.Y.: McGraw-Hill, 2011. 320 p.
16. *Kraskouski A., Nikalaichuk V., Kulikouskaya V., Hileuskaya K., Kalatskaja J., Nedved H., Laman N., Agabekov V.* // Soft Materials. 2021. С. 1–8. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2021.1877726>
17. *Marchiosi R., dos Santos W.D., Constantin R.P. et al.* // Phytochem. Rev. 2020. V. 19. P. 865–906.
18. *Salachna P., Zawadzka A.* // J. Ecol. Eng. 2014. V. 15. № 3. P. 97–102.
19. *Lee Y.S., Kim Y.H., Kim S.B.* // Hort Science. 2005. V. 40. № 5. P. 1333–1335.
20. *Luan le Q., Ha V.T.T., Nagasawa N., Kume T., Yoshii F., Nakanishi T.M.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2005. V. 41. (Pt 1). P. 49–57.
21. *Недведь Е.Л., Калацкая Ж.Н., Минкова В.В., Овчинников И.А., Гилевская К.С., Куликовская В.И., Красковский А.И., Ламан Н.А.* // Ботаника (исследования). 2020. № 49. С. 300–308.
22. *Acosta-Motos J.R., Ortuño M.F., Bernal-Vicente A., Diaz-Vivanco P., Sanchez-Blanco M.J., Hernandez J.H.* // Agronomy. 2017. V. 7. № 1. P. 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
23. *Verbruggen N., Hermans C.* // Amino Acids. 2008. V. 35. № 4. P. 753–759.
24. *Колунаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О.* // Вісник Харківського національного аграрного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. 2014. Вип. 2. № 32. С. 6–22.
25. *Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F.* // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 19. № 9. P. 998–1011.
26. *Signorelli S., Coitin O., E.L., Borsani O., Monza J.* // J. Phys. Chem. 2014. V. 118. № 1. P. 37–47.
27. *Колунаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Кабашишникова Л.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 419–440.
28. *Вайнер А.А., Колунаев Ю.Е., Хрунач В.А.* // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 5. С. 428–436.
29. *Houimli S.M., Denden M., Mouhandes B.D.* // EurAsia J. BioSci. 2010. V. 4. P. 96–104.
30. *Yildizli A., Çevik S., Ünyayar S.* // Acta Physiol. Plant. 2018. V. 40. P. 122.
31. *Schmitt Fr.J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Los D.A., Kuznetsov V.I., Al-lakhverdiev S.I.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 835–848.
32. *Kumar V., Khare T., Sharma M., Wani S.H.* // Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. / Ed. M.I.R. Khan, N.A. Khan. Singapore: Springer Nature, 2017. P. 179–184.
33. *Khare T., Kumar V., Kavi Kishor P.B.* // Protoplasma. 2015. V. 252. № 4. P. 1149–1165.
34. *Qureshi M.I., Abidin M.Z., Ahmad J., Iqbal M.* // Phytochemistry. 2013. V. 95. P. 215–223.
35. *Parida A.K., Das A.B.* // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2005. V. 60. № @. P. 324–349.
36. *Радюкина Н.Л., Карташов А.В., Иванов Ю.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В.* // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 902–912.
37. *Vijayalakshmi T., Vijayakumar A.S., Kiranmai K., Nareshkumar A., Sudhakar C.* // Amer. J. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1802–1819.
38. *Yasar F., Uzal O., Yasar O.* // Fresenius Environ. Bull. 2016. V. 25. P. 37–42.
39. *Singh D., Roy B.K.* // Braz. J. Bot. 2016. V. 39. P. 67–76.
40. *Koleška I., Hasanagić D., Maksimović I., Bosančić B., Kukavica B.* // J. Plant Nutr. Soil Sci. 2017. V. 180. P. 105–112.
41. *Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S.* // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. V. 30. P. 161–175.
42. *Wan Y.Y., Chen S.Y., Huang Y.W.* // Sci. Hort. 2014. V. 173. P. 54–64.
43. *Yang C.M., Chang I.F., Lin S.J., Chou C.H.* // Bot. Bull. Acad. Sin. 2004. V. 45. P. 119–125.
44. *Hidangmayum A., Dwivedi P., Katiyar D., Heman-taranjan A.* // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2019. V. 25. № 2. P. 313–326.

Growth Parameters and Antioxidant Activity in Cucumber Seedlings with Application of Chitosan and Hydroxycinnamic Acids Conjugates under Salt Stress

E. L. Nedved^{a, *}, J. N. Kalatskaja^a, I. A. Ovchinnikov^a, E. I. Rybinskaya^a, A. N. Kraskouski^b, V. V. Nikalaichuk^b, K. S. Hileuskaya^b, V. I. Kulikouskaya^b, V. E. Agabekov^b, and N. A. Laman^a

^a V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus

^b Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus
*e-mail: nedved_e@tut.by

Chitosan-ferulic and chitosan-caffeic acids conjugates with a ratio of 5:1 were synthesized by the modified carbodiimide method that allows to regulate the degree of acid cross-linking from 0.5 to 3.4%. The biological activity of the synthesized conjugates was studied in 7-day-old cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.). A significant growth-stimulating effect of conjugates seed treatment was observed in stressful conditions of growing seedlings, in the absence of antioxidant status changes in comparison with control plants. The coordination effect of conjugates on the seedling organs growth under different growing conditions was established, which is manifested in an increase of the roots to shoot length ratio. Possible mechanisms of alleviate prolonged salinity-induced stress with chitosan and hydroxycinnamic acids conjugates seed treatment due to a decrease in the lipid peroxidation intensity in seedling cotyledons, stabilization of the proline level, and an increase in the total peroxidase activity were discussed.

Keywords: cucumber seedlings, NaCl salt stress, conjugates, chitosan, hydroxycinnamic acids, morphometric parameters, proline, lipid peroxidation, antioxidant activity

КОНЬЮГАТЫ ИММУНОГЛОБУЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК – НАНОЧАСТИЦА ЗОЛОТА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ СУЛЬФОНИЛАМИДА

© 2022 г. Д. В. Сотников¹, Л. В. Баршевская¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев¹, *

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

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

Поступила в редакцию 12.05.2021 г.

После доработки 30.07.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Предложена новая методика определения состава конъюгатов белков с наночастицами, основанная на использовании флуорескамина в качестве флуоресцентной метки и позволяющая получать результаты с высокой точностью при минимальной продолжительности и трудоемкости. Охарактеризованы по составу и связыванию иммуноглобулинов конъюгаты наночастиц золота со стрептококковым белком G. Установлены оптимальные концентрации белка G 8 мкг/мл и золотых наночастиц – 2.5 нМ (ОП₅₂₀ = 5) со средним диаметром 25 нм. Полученные конъюгаты применили для разработанного иммунохроматографического анализа антибиотика сульфониламида – важного контролируемого загрязнителя пищевой продукции. Непрямое мечение специфических антител позволило использовать в анализе неочищенную кроличью антисыворотку. Визуальный и инструментальный пределы обнаружения сульфониламида составили 100 и 0.3 нг/мл соответственно. Продолжительность анализа – 10 мин. Проведена апробация тест-систем для характеристики проб мёда.

Ключевые слова: иммунохроматография, наночастицы золота, флуорескамин, сульфониамиды, мед

DOI: 10.31857/S0555109922010081

Уникальные физико-химические и биологические свойства способствовали применению наночастиц золота (НЧЗ) и их модифицированных производных в разнообразных областях науки и техники [1, 2]. Особенно востребованы комплексы НЧЗ с различными белками, используемые для направленного транспорта лекарств [3, 4], иммунизации [5], биоимиджинга [6, 7], в качестве маркерных агентов в аналитических системах [8–10]. Несмотря на накопленный опыт и большое количество работ, посвященных конъюгированию белков с наночастицами, полученные данные остаются неоднозначными и в ряде случаев противоречащими друг другу [11]. Открытым также остается вопрос зависимости функциональной активности конъюгатов от их состава.

Для изучения структуры и состава конъюгатов белок–НЧЗ используются различные методы: дифференциальная центробежная седиментация [12], спектрофотометрия [13–15], флуориметрия [11, 16–18], модификации иммуноферментного анализа [19, 20], высокоэффективная жидкостная хроматография [21], просвечивающая электронная микроскопия [22] и др. Однако у этих методов есть ряд недостатков: недостаточная чувствитель-

ность, сложная пробоподготовка, необходимость дорогостоящего оборудования, большое количество манипуляционных стадий и, как следствие, низкая точность и воспроизводимость результатов. Некоторые методы, например, измерение триптофановой флуоресценции, пригодны лишь для белков определенного состава [11], поэтому актуальна разработка универсального и нетрудоемкого метода определения состава конъюгатов наночастиц с белками.

Предлагаемый в данной работе метод основан на мечении белков флуорескамином с последующей регистрацией флуоресценции. Флуорескамин – флуорогенный краситель с длиной волны возбуждения 390 нм, используемый в генетических исследованиях, в тонкослойной и бумажной хроматографии, при измерениях протеолитической активности и др. При взаимодействии флуорескамина с первичными аминогруппами белка образуются интенсивно флуоресцирующие производные [23–25]. Поскольку практически все белки содержат лизин, флуорескамин – универсальный реагент для мечения белков. Преимуществом флуорескамина является то, что его исходная форма не флуоресцирует, флуоресцен-

ция появляется только после взаимодействия с аминокруппой и поэтому измерения характеризуются низким фоновым сигналом. Реакция с аминокруппами протекает за несколько секунд. К тому же флуорескамин устойчив лишь в органических растворителях, а в воде гидролизуеться с выпадением продукта в осадок в течение 1–2 мин, что исключает необходимость отделять продукт реакции от несвязанной метки. Отсутствие дополнительных стадий обуславливает высокую производительность измерений. Разработанная методика обеспечивает инструментарий для простого и быстрого количественного определения белка, сорбированного на поверхности наночастиц. В качестве такого белка в экспериментах использовали иммуноглобулин-связывающий стрептококковый белок G, который часто применяется в иммунохимических методах для непрямого мечения антител [26, 27].

На основании предложенной методики были выбраны препараты золотых наночастиц с иммобилизованным белком G с оптимальной нагрузкой, использованные для разработки иммунохроматографического анализа (ИХА) сульфонамидного антибиотика сульфониламида (СА). Сульфонамиды широко используются в сельском хозяйстве для борьбы с инфекционными заболеваниями. Остаточные количества сульфонамидов в пищевых продуктах животного происхождения могут привести к развитию ряда заболеваний и аллергических реакций у людей, а также к возникновению резистентных штаммов микроорганизмов, что требует постоянного контроля и предотвращения чрезмерного употребления антибиотиков данного класса [28, 29].

Цель работы – разработка методики определения состава конъюгатов белков с наночастицами и ее применение для создания иммунохроматографической тест-системы на сульфониламид.

МЕТОДИКА

Получение наночастиц золота. НЧЗ синтезировали согласно методу Френса [30]. 1 мл 1%-ного водного раствора HAuCl_4 (“Sigma-Aldrich”, США) вносили в 97.5 мл воды, нагревали смесь до кипения, а затем при активном перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия (“Химмед”, Россия). Раствор кипятили 15 мин, затем охлаждали и хранили при 4°C.

Определение размеров наночастиц золота методом просвечивающей электронной микроскопии. Снимки препаратов НЧЗ получали с помощью микроскопа CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 33000. Фотографии сканировали и анализировали с помощью программы Image Tool (“UTHSCSA”, США),

характеризуя не менее 120 изображений одиночных частиц.

Определение состава конъюгатов НЧЗ–белок. Раствор НЧЗ разливали в 10 пробирок по 2.0 мл, двукратно центрифугировали при 10000 g, затем отбирали надосадочную жидкость. Осадок взбалтывали (объем оставшейся в пробирке жидкости доводили надосадочной жидкостью до 0.2 мл). Стоковый раствор белка G (“Имтек”, Россия) с концентрацией 240 мкг/мл разводили надосадочной жидкостью для достижения конечных концентраций белка 24, 16, 10, 7, 5 и 3 мкг/мл. По 0.2 мл данных растворов белка в надосадочной жидкости добавляли к 0.2 мл растворов НЧЗ, полученных после центрифугирования, а оставшиеся растворы белка использовали для построения градуировочной зависимости. Белок G инкубировали с НЧЗ 30 мин при комнатной температуре, двукратно центрифугировали при 10000 g, отбирали 0.2 мл надосадочной жидкости и переносили в микропланшет (“Roskilde”, Дания). Градуировочные растворы также переносили в микропланшет по 0.2 мл. К полученным растворам добавляли по 10 мкл раствора флуорескамина (“Sigma-Aldrich”, США) в ацетоне (100 мг/мл), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли флуоресценцию. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью фотометра Perkin Elmer En Spire 2300 (“Waltham”, США) при длине волны возбуждающего света 390 нм в диапазоне длин волн испускаемого света 450–550 нм.

Получение конъюгата НЧЗ с белком G для использования в ИХА. Раствор НЧЗ (оптическая плотность при 520 нм: $D_{520} = 1$) доводили карбонатом калия до pH 8.5–9.0, после чего вносили в этот раствор белок G до концентрации 8 мкг/мл. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре, затем вносили 10%-ный раствор БСА (“Boval Biosolutions”, США) и выдерживали еще 10 мин при интенсивном перемешивании. Полученный раствор центрифугировали 15 мин при 10000 g. Осадок отбирали и вносили 1%-ный раствор БСА до конечного объема 1 мл. Полученный раствор хранили при 4°C.

Получение антисывороток против СА. Для синтеза использовали производное СА с карбоксильной группой $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$, предоставленное А.А. Формановским (Институт биоорганической химии РАН, Россия). Конъюгат данного производного и бычьего сывороточного альбумина (СА-БСА) синтезировали карбодиимидным методом [31] и использовали для иммунизации кроликов породы шиншилла массой 3–4 кг согласно [32].

Для первой иммунизации раствор иммуногена в фосфатно-солевом буфере (ФБС; 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.4, с 0.1 М NaCl) эмульгировали с равным объемом полного адьюванта

Фрейнда до конечной концентрации 1 мг/мл (по белку). Эту смесь (1.0 мл) вводили внутривенно и подкожно. Впоследствии кролики получали бустерные инъекции, содержавшие 0.5 мг иммуногена на животное, подкожно в ФБС с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда и внутривенно в ФБС. Через неделю у кроликов отбирали кровь. Циклы реиммунизации повторяли с 5-недельным интервалом.

Изготовление иммунохроматографических тест-систем. Комплектация тест-полосок включала рабочую мембрану, мембраны для нанесения образца и конъюгата, а также конечную впитывающую мембрану. В качестве рабочей использовали нитроцеллюлозную мембрану UniSart CN95 (“Sartorius”, Германия), впитывающей – мембрану CFSP 223000 (“Millipore”, США), мембраны для нанесения конъюгата – непередобработанную мембрану PT-R5 (“Advanced Microdevices”, Индия). С помощью автоматического диспенсера IsoFlow (“Imagene Technology”, США) на рабочей мембране формировали аналитическую зону с иммобилизованным конъюгатом СА-БСА (3 мг/мл) в ФБС и контрольную зону с иммобилизованным антителами козы против иммуноглобулинов кролика (“Имтек”, Россия) в концентрации 5 мг/мл. Конъюгат НЧЗ с белком G наносили на мембрану для конъюгата ($D_{520} = 10$, объем нанесения – 13 мкл/мм). После нанесения реагентов мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого получали полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Нарезку и упаковку проводили в помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при комнатной температуре.

Проведение иммунохроматографического анализа СА. ИХА проводили при комнатной температуре. В ФБС, содержащий 1% детергента твин-20 (ФБСТ), или в контаминированные пробы мёда, разбавленные ФБСТ в соотношении 1 : 4, вносили раствор СА для достижения его конечных концентраций в диапазоне 0.8–100 нг/мл, а также антисыворотку в разведении 1 : 800. Тест-полоски вносили в пробы в вертикальном положении, инкубировали 10 мин, а затем извлекали и оценивали результат ИХА визуально. С помощью программного обеспечения TotalLab TL120 (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания) проводили оцифровку изображений тест-полосок и определяли интенсивности окрашивания контрольной и аналитической зон.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Размерная характеристика наночастиц золота. Для определения среднего диаметра и гомоген-

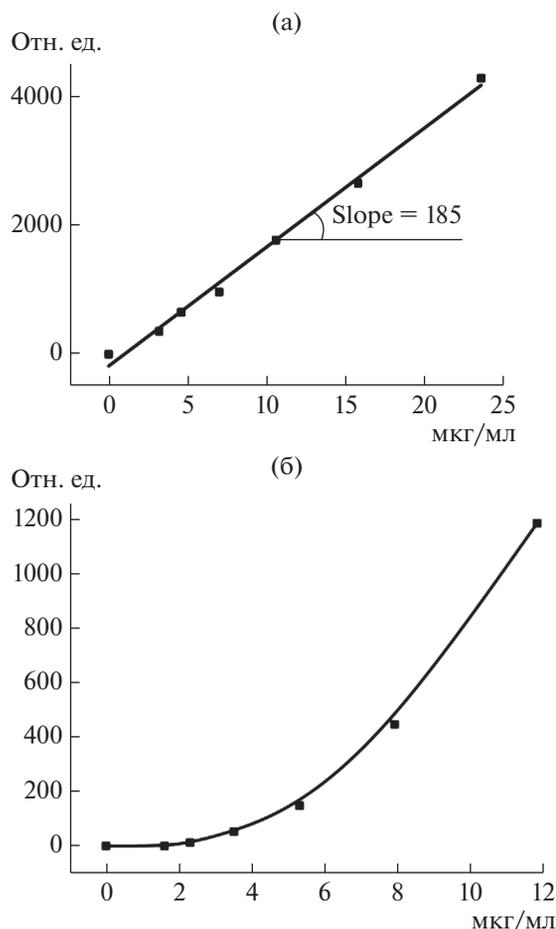


Рис. 1. Зависимости интенсивности флуоресценции (отн. ед., I) от добавленной концентрации белка G (мг/мл) в калибровочных растворах (а) и в реакционных растворах после центрифугирования (б).

ности НЧЗ использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Согласно полученным данным, синтезированные наночастицы характеризовались сферической формой и гомогенным распределением по размерам. Длина большей оси наночастиц составила 25 ± 3 нм, меньшей оси – 23 ± 4 нм, средний диаметр – 25 ± 5 нм.

Характеристика состава конъюгатов белок G–НЧЗ. Для определения состава конъюгатов использовали метод флуоресцентной спектроскопии, вводя флуорескамин в качестве метки в градуировочные и реакционные растворы. Получали зависимости интенсивности флуоресценции при 490 нм от концентрации добавленного белка для градуировочных растворов (рис. 1а) и надосадочных жидкостей (рис. 1б). На основании линейризованной градуировочной зависимости (R-фактор был больше 0.99) по величинам флуоресценции вычисляли содержание белка в надосадочных жидкостях. Затем рассчитывали количество свя-

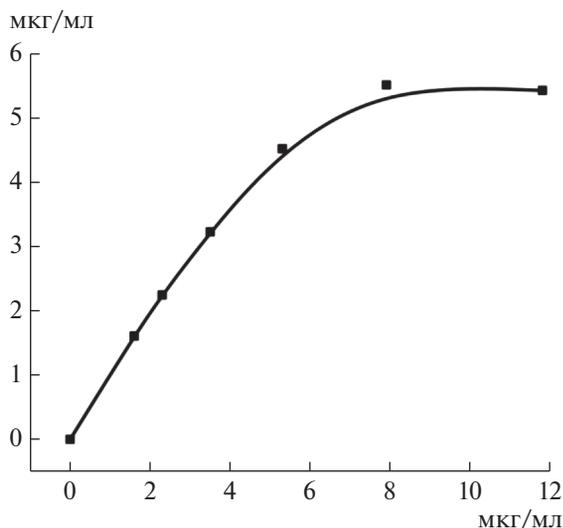


Рис. 2. Зависимость концентрации белка G (мкг/мл) в составе конъюгата с НЧЗ от концентрации добавленного белка.

занного белка в конъюгатах как разницу между добавленным и несвязавшимся белком.

Полученная зависимость между количествами добавленного и связанного с НЧЗ белка G представлена на рис. 2. Плато на кривой отражает насыщение поверхности НЧЗ иммобилизованным белком.

При выборе оптимального состава конъюгата белок G–НЧЗ и протокола его получения исходили из критерия максимального связывания иммобилизуемого белка. Выбор этого критерия определялся использованием не прямой схемы ИХА, в которой рост реакционной способности конъюгата обеспечивал большую интенсивность сигнала и более чувствительное выявление аналита. При этом для других форматов ИХА ранее отмечалась оправданность использования конъюгатов НЧЗ–антител с меньшей нагрузкой. Так, в сэндвич-ИХА сокращение нагрузки антител в 2–4 раза снижало расход специфических реагентов без значимых изменений аналитических параметров [33], а в конкурентном ИХА приводило к сдвигу рабочего диапазона градуировочных кривых в область более низких концентраций [34]. При выборе оптимальных составов конъюгатов для данных форматов ИХА также может быть использована предложенная в данной работе методика со взаимодействием иммуноглобулинов с флуорескаминном.

Следует отметить, что такое решение позволило работать даже с нефракционированной поликлональной антисывороткой. Поскольку иммуноглобулиновая фракция антисыворотки содержит небольшую долю антител против использованного антигена (как правило, менее 5% [35]), то боль-

шая часть иммуноглобулинов в сыворотке будет блокировать реакционные центры конъюгата НЧЗ с белком G, препятствуя эффективному связыванию маркера в аналитической зоне. Тем не менее, использование установленной максимальной нагрузки иммобилизуемых антител обеспечило возможность эффективной регистрации результатов анализа и выявления аналита в низких концентрациях.

Выбранная оптимальная концентрация белка G для синтеза конъюгата составила 8 мкг/мл, что соответствовало ранее установленным требованиям для конъюгата белок G–НЧЗ, используемого в серодиагностике [36]. При данной концентрации обеспечивается иммобилизация 133 молекул белка G на одну НЧЗ диаметром 25 нм.

Иммунохроматографический анализ СА. Конкурентный ИХА был реализован в формате с непрямым введением маркера. Ранее для ряда систем отмечалось, что не прямое мечение антител с помощью аффинных взаимодействий (например, с использованием антивидовых антител, стафилококкового белка A, стрептококкового белка G или других иммуноглобулин-связывающих молекул) дает значительное преимущество в иммуноанализе по сравнению с использованием антител, непосредственно иммобилизованных на маркерных частицах [37–40]. Преимущества непрямого мечения состоят в возможности независимо варьировать концентрацию маркера (для интенсивного сигнала) и специфических антител (для эффективной конкуренции), используя для этого два разных реагента. В традиционном же ИХА с прямым мечением изменять концентрации специфических антител и маркера можно только одновременно и однонаправленно.

Для проведения анализа пробу смешивали с препаратом специфических антител, инкубируя в течение 1 мин, после чего в эту смесь погружали тест-полоску. В результате происходило двухступенчатое взаимодействие – образование комплекса специфических антител с антигеном и его выявление сорбированным на подложке конъюгатом белка G с меткой (НЧЗ). Продолжительность иммунохроматографии составляла 10 мин, после чего проводили регистрацию результатов.

Аналитические параметры тест-системы были установлены по результатам определения СА в ФБСТ и в искусственно контаминированных пробах мёда. На рис. 3 представлены отсканированные изображения тест-полосок после анализа. При цифровой регистрации предел обнаружения СА, определявший по статистически достоверному снижению интенсивности окрашивания относительно окрашивания в отсутствие СА, был равен 0.3 нг/мл, рабочий диапазон – 0.6–1.0 нг/мл в ФБСТ. Предел обнаружения в мёде составил 0.37 нг/мл, рабочий диапазон – 0.37–1.5 нг/мл.

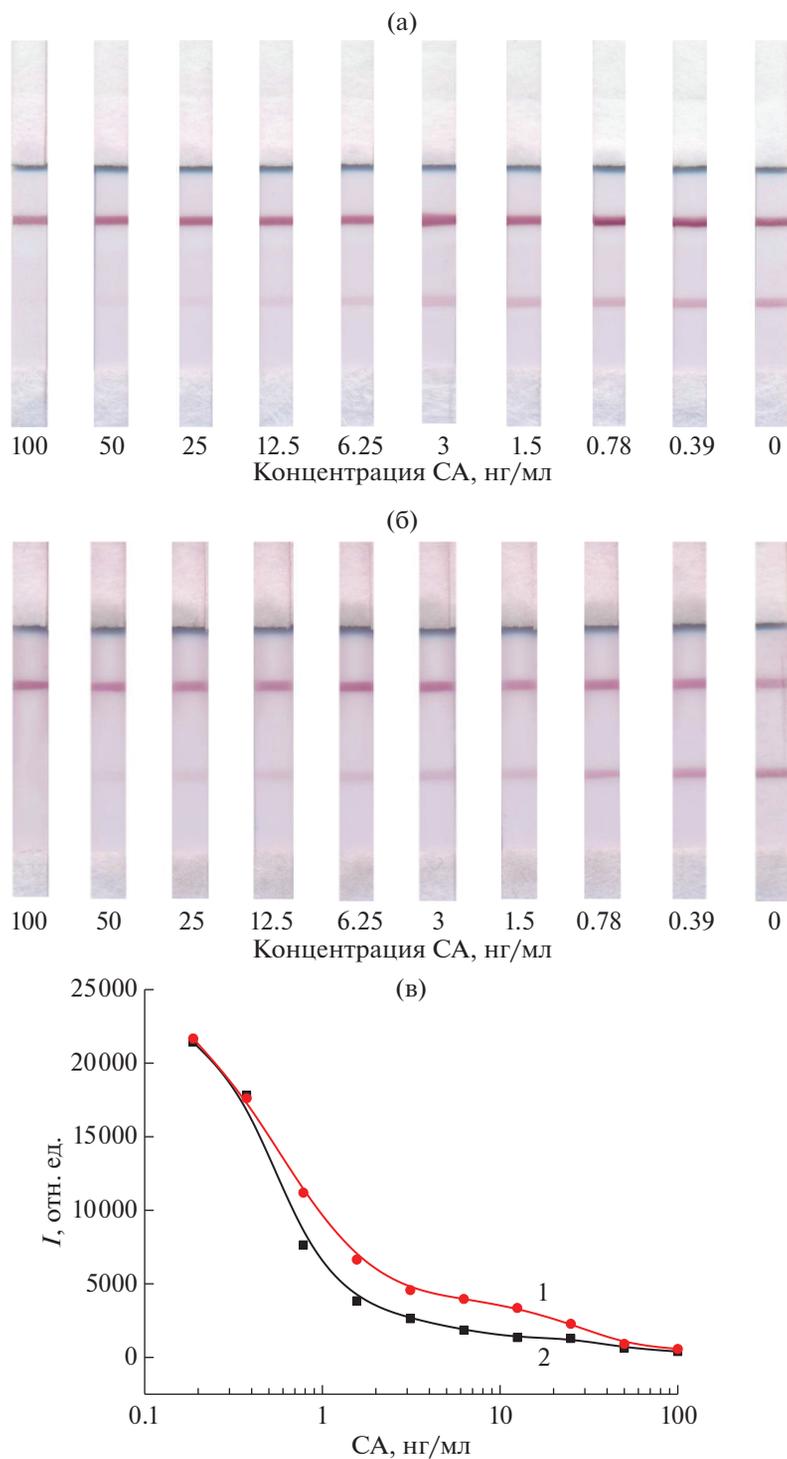


Рис. 3. Иммунохроматографическое определение СА: внешний вид тест-полосок при тестировании проб в ФБСТ (а), в меде (б) и градуировочные кривые (в; 1 – в меде, 2 – в ФБСТ).

Визуальный предел обнаружения СА, соответствовавший исчезновению окрашивания в аналитической зоне, составил 100 нг/мл, что связано с сохранением относительно стабильного низкого сигнала в широком диапазоне концентраций (от 3 до

50 нг/мл) за рамки рабочего диапазона количественного анализа.

Полученные результаты соответствуют установленным нормам по максимально допустимому содержанию сульфонамидов в пищевой про-

дукции (0.1 мг/кг) [41, 42]. Использование в тест-системе конъюгата наночастиц золота с белком G подтверждает его эффективность для обеспечения высокочувствительного анализа, а универсальность данного маркера позволяет его использовать для детекции различных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-76-10033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // *Biomed. Opt. Express*. 2019. V. 10. № 7. P. 3152–3182.
- Mieszawska A.J., Fayad Z.A., Cormode D.P. // *Mol. Pharm.* 2013. V. 10. № 3. P. 831–847.
- Han G., Ghosh P., Rotello V.M. // *Nanomedicine*. 2007. V. 2. № 1. P. 113–123.
- Arvizo R., Bhattacharya R., Mukherjee P. // *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2010. V. 7. № 6. P. 753–763.
- Dykman L.A. // *Expert Rev. Vaccines*. 2020. V. 19. № 5. P. 465–477.
- Klein S., Petersen S., Taylor U., Rath D., Barcikowski S. // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. № 3. Article 036015. doi.org/https://doi.org/10.1117/1.3461170
- Mahan M.M., Doiron A.L. // *J. Nanomater.* 2018. V. 2018. Article 5837276. https://doi.org/10.1155/2018/5837276
- Baptista P., Pereira E., Eaton P., Doria G., Miranda A. et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. № 3. P. 943–950.
- Bailes J., Mayoss S., Teale P., Soloviev M. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 906. P. 45–55.
- Li, Z., Sheng W., Liu Q., Li S., Shi Y. et al. // *Anal. Methods*. 2018. V. 10. № 28. P. 3506–3513.
- Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 907–923.
- Wang R., Chen L., Li D., Liu R., Ge G. // *Part. Part. Syst. Charact.* 2017. V. 34. № 12. Article 1700134. https://doi.org/10.1002/ppsc.201700134
- Iosin M., Toderas F., Baldeck P.L., Astilean S. // *J. Mol. Struct.* 2009. V. 924–926. P. 196–200.
- Kaur K., Forrest J.A. // *Langmuir*. 2012. V. 28. № 5. P. 2736–2744.
- Oliverio R., Liberelle B., Murschel F., Garcia-Ac A., Banquy X., De Crescenzo G. // *ACS Appl. Nano Mater.* 2020. V. 3. № 10. P. 10497–10507.
- Duan Y., Liu Y., Shen W., Zhong W. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 22. P. 12160–12167.
- Kozłowski R., Ragupathi A., Dyer R.B. // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. № 8. P. 2691–2700.
- Zhang L., Hu D., Salmain M., Liedberg B., Boujday S. // *Talanta*. 2019. V. 204. № 8. P. 875–881.
- Sotnikov D.V., Radchenko A.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Eurasian J. Anal. Chem.* 2016. V. 11. № 3. P. 169–179.
- Tripathi K., Driskell J.D. // *ACS Omega*. 2018. V. 3. № 7. P. 8253–8259.
- Liu S., Horak J., Höldrich M., Lämmerhofer M. // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 989. P. 29–37.
- Busch R.T., Karim F., Weis J., Sun Y., Zhao C., Vasquez E.S. // *ACS Omega*. 2019. V. 4. № 12. P. 15269–15279.
- Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M. // *Science*. 1972. V. 178. № 4063. P. 871–872.
- Weigele, M., De Bernardo S., Leimgruber W., Cleeland R., Grunberg E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973. V. 54. № 3. P. 899–906.
- Duan Y., Liu Y., Shen W., Zhong W. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 22. P. 12160–12167.
- Choe W., Durgannavar T.A., Chung S.J. // *Materials*. 2016. V. 9. № 12. Article 994. doi.org/https://doi.org/10.3390/ma9120994
- Nezlin R. In: *The Immunoglobulins*. Academic Press: N.Y., 1998. P. 219.
- Baran W., Adamek E., Ziemiańska J., Sobczak A. // *J. Hazard. Mater.* 2011. V. 196. P. 1–15.
- Jiang J., Wang G. // *IOP Conf. Ser. Earth Envir. Sci.* 2017. V. 100. Article 012040. https://doi.org/10.1088/1755-1315/100/1/012040
- Frens G. // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.
- Eremın S.A., Murtazina N.R., Ermolenko D.N., Zherdev A.V., Martıanov A.A. et al. // *Anal. Lett.* 2005. V. 38. № 6. P. 951–969.
- Martıanov A.A., Zherdev A.V., Eremın S.A., Dzantiev B.B. // *Int. J. Envir. Anal. Chem.* 2004. V. 84. № 13. P. 965–978.
- Byzova N.A., Safenkova I.V., Slutskaya E.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. № 11. P. 2737–2746.
- Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 2. P. 6378–6384.
- Radunz A. // *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences*. 1983. V. 38. № 3–4. P. 297–301.
- Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2020. V. 10. № 2. P. 4988–4992.
- Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 86. P. 575–579.
- Берлина А.Н., Бартош А.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Ху Ч., Дзантиев Б.Б. // *Российские нанотехнологии*. 2018. Т. 13. № 7–8. С. 80–87. (Berlina A.N., Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. // *Nanotechnologies in Russia*. 2018. V. 13. № 7–8. P. 430–438.)
- Majdinasab M., Zareian M., Zhang Q., Li P.W. // *Food Chem.* 2019. V. 275. P. 721–729.
- Di Nardo F., Cavallera S., Baggiani C., Giovannoli C., Anfossi L. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 36. P. 32758–32768.
- Технический регламент Таможенного Союза “О безопасности пищевой продукции” ТР ТС 021/2011. М.: Центрмг, 2021. 261 с.
- European Union Council Regulation 2377/90/EEC, C.R. // *Off. J. Eur. Commun.* 1990. V. L224. P. 1–8.

Conjugates of Immunoglobulin-Binding Protein and Gold Nanoparticle: Determination of Composition and Application in Immunochromatographic Analysis of Sulfonylamide

D. V. Sotnikov^a, L. V. Barshevskaya^a, A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a, *}

^a *A.N. Bach Institute of Biochemistry. Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

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

A new method for determining the composition of conjugates between proteins with nanoparticles is proposed, based on the use of fluorescamine as a fluorescent label and which allows obtaining results with high accuracy with a minimum duration and laboriousness. Conjugates of gold nanoparticles with streptococcal protein G were characterized by the composition and binding of immunoglobulins. The synthesis was found to be optimal at protein G concentration of 8 µg/mL and a concentration of gold nanoparticles with an average diameter of 25 nm equal to 2.5 nM ($OD_{520} = 5$). The resulting conjugates were used in the developed immunochromatographic assay of the antibiotic sulfonylamide, an important controlled contaminant of food products. Indirect labeling of specific antibodies allowed the use of crude rabbit antiserum in the assay. The visual and instrumental limits of detection for sulfonylamide were 100 and 0.3 ng/mL, respectively. The duration of the analysis is 10 min. The test systems were applied for the characterization of honey samples.

Keywords: immunochromatography, gold nanoparticles, fluorescamine, sulfonamides, honey

УДК 677.019.543:543.054

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

© 2022 г. В. А. Зотов¹, *, В. В. Бессонов¹, Д. В. Рисник¹

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, 109240 Россия

*e-mail: arkont-87@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2021 г.

После доработки 07.07.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

В обзоре рассмотрены основные современные методы определения жирных кислот (ЖК) в биологических объектах, а также менее распространенные, но перспективные методы. Описываются и сравниваются преимущества, недостатки и перспективы этих методов. Особое внимание уделено особенностям подготовки биологических образцов, таким как экстракция липидов и дериватизация жирных кислот. Рассматриваются методические аспекты определения жирных кислот методами газовой хроматографии (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), особенности использования различных типов неподвижных фаз используемых для хроматографического разделения ЖК. Проанализированы возможности использования капиллярного электрофореза (КЭ) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для анализа жирных кислот, особые требования и ограничения этих методов при работе с биоматериалом.

Ключевые слова: липиды, полиненасыщенные жирные кислоты, газовая хроматография, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, сверхкритическая флюидная хроматография, ЯМР-спектроскопия

DOI: 10.31857/S0555109922010111

Жирные кислоты (ЖК) — ациклические одноосновные карбоновые кислоты, содержащиеся в жирах, маслах и восках биологического происхождения. В организме человека ЖК присутствуют в основном в виде продуктов этерификации, представленных триглицеридами, фосфолипидами и эфирами холестерина [1]. ЖК, как правило, содержат неразветвленную цепь из атомов углерода C₄-C₂₄, (включая углерод карбоксильной группы) и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. Разветвленные жирные кислоты по сравнению с жирными кислотами с неразветвленной цепью в составе липидов растений и животных встречаются реже. В бактериях довольно часто встречаются моометил-разветвленные жирные кислоты [2].

По степени ненасыщенности ЖК подразделяют на насыщенные, в которых отсутствуют кратные связи, мононенасыщенные, содержащие одну двойную связь, и полиненасыщенные, в структуре которых содержится две и более кратные связи [3].

Ряд полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), необходимых животным и человеку, но которые не образуются в ходе биосинтеза в их организмах, относят к незаменимым. К ним

относятся 18-атомные кислоты семейств n-6 и n-3 (омега-6 и омега-3): линолевая кислота с двумя двойными связями 18:2n-6 и альфа-линоленовая кислота с тремя двойными связями 18:3n-3 [4].

Биологическая роль ЖК заключается в их участии в формировании клеточных мембран, внутриклеточных структур и органелл, а также в энергетическом обмене. Помимо этого, они участвуют в синтезе биологически активных соединений, таких как эйкозаноиды [5].

Изучение содержания ЖК и их метаболических профилей важно для лабораторно-клинической диагностики [6]. Например, изучение маркеров метаболизма ЖК применяется в диагностике рисков развития сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома. Масштабные клинические и эпидемиологические исследования больших групп пациентов (более десяти тысяч человек) показали, что повышенное потребление омега-3 ПНЖК существенно снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний у здоровых людей и на 35% снижает смертность среди людей, перенесших эти заболевания [7]. По современным представлениям влияние эйкозапентаеновой кислоты на сердечно-сосудистую систему связано с действием ее производных — эйкозаноидов,

которые являются ингибиторами тромбообразования, способствуют расширению просвета сосудов, участвуют в регуляции иммунного ответа [8–10]. Возможные механизмы кардиопротекторных эффектов омега-3 ПНЖК заключаются в понижении уровней триглицеридов, ослаблении аритмий, снижении кровяного давления, предотвращении агрегации кровяных телец [11, 12].

Многие исследования связывают аномалии в метаболизме ЖК с развитием некоторых видов онкологических заболеваний. Однако общие тенденции изменений липидных профилей плазмы крови у больных имеют ряд противоречий, что связано с различием в механизмах синтеза и использования липидов при различных разновидностях раковых заболеваний [13, 14].

Нарушение нормальных процессов метаболизма ЖК может являться причиной хронических нервно-мышечных заболеваний, которые могут сопровождаться тяжелыми осложнениями, в том числе со смертельным исходом, включая миопатию, прогрессирующую кардиомиопатию, рецидивирующую энцефалопатию и т.д.

В эпидемиологических исследованиях установлена прямая корреляция между недостаточной обеспеченностью омега-3 ПНЖК и развитием психических и нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на то, что в настоящее время не найдено средств лечения одного из самых распространенных видов деменции – болезни Альцгеймера [7, 15], имеются достоверные данные, свидетельствующие о возможности снижения риска развития и даже замедления развития этого заболевания при дополнительном употреблении докозагексаеновой кислоты [16].

Чтобы раскрыть биологическую значимость ЖК в заболеваниях, необходимо дополнительное изучение роли и механизмов их метаболизма, совершенствование методик их количественного определения в биологических образцах, что позволит внести значительный вклад в практику лабораторно-клинической диагностики. Разработка и совершенствование надежных процедур определения ЖК в свободных и этерифицированных формах позволит усовершенствовать методы диагностики метаболического синдрома, наследственных и онкологических заболеваний, а также осуществить выявление отклонений у людей, находящихся в зоне риска на ранней стадии.

Изучение содержания ЖК в биологических объектах является сложной аналитической задачей из-за большого разнообразия веществ, в состав которых входят ЖК, и из-за сложного характера матрицы (посторонних компонентов образца). В настоящее время в основном используются хроматографические методы: газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), сверхкритическая флюидная

хроматография (СФХ), а также комбинированные методы – масс-спектрометрия в сочетании с различными способами разделения, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) [17–19].

Газовая хроматография. Среди инструментальных методов анализа ЖК наиболее распространенным является ГХ с тем или иным способом детектирования. Наиболее часто используется пламенно-ионизационный детектор. Его основными преимуществами являются низкие пределы обнаружения (на уровне нг/мл) и широкий линейный диапазон [20].

Исторически это был первый хроматографический метод, использованный для анализа ЖК [17]. Известно, что основные требования, предъявляемые к анализам при использовании этого метода разделения, – летучесть, термостабильность и инертность. Поскольку ЖК характеризуются термолабильностью, низкой летучестью, наличием полярных функциональных групп, а также легко поддаются полимеризации и дегидратации [1, 21, 22], что препятствует их прямому качественному и количественному определению методами ГХ [23]. Такие свойства обуславливают необходимость проведения предварительной дериватизации перед проведением анализа. Дериватизация позволяет повысить летучесть ЖК, а также улучшает эффективность их разделения и повышает чувствительность определения [24]. В литературе описано множество подходов к дериватизации ЖК. Чаще всего легколетучие производные ЖК получают путем одностадийной кислотной или щелочной переэтерификации.

Кисотно-катализируемые реакции. В случае кислотно-катализируемых реакций переэтерификации в прошлом широкое распространение получило использование растворов соляной (HCl) или серной (H₂SO₄) кислот в спиртах [25]. Обычно применяют 2–10% растворы в метаноле (CH₃OH). Однако в современной практике чаще используют различные кислоты Льюиса: например, фторид бора (BF₃) и хлорид алюминия (AlCl₃) [26, 27]. Общая схема кислотно-катализируемых реакций дериватизации липидов представлена на рис. 1а.

Применение трифторида бора для определения ЖК описано еще в 1964 г. [28]. В настоящее время есть множество данных о применении BF₃ при анализе биологических образцов, в том числе для трансметилирования липидов в плазме крови человека [29], эритроцитах и сыворотке крови [23, 30], мышечной ткани коров и овец [31, 32], печени рыб [33], бактериях [34]. BF₃ в метаноле позволяет конвертировать кислоты всех классов липидов (включая свободные ЖК) в метиловые эфиры [27]. Дериватизация проводится при 100°C. Этерификация свободных ЖК в таких условиях происходит за 2 мин, переэтерификация фосфоли-

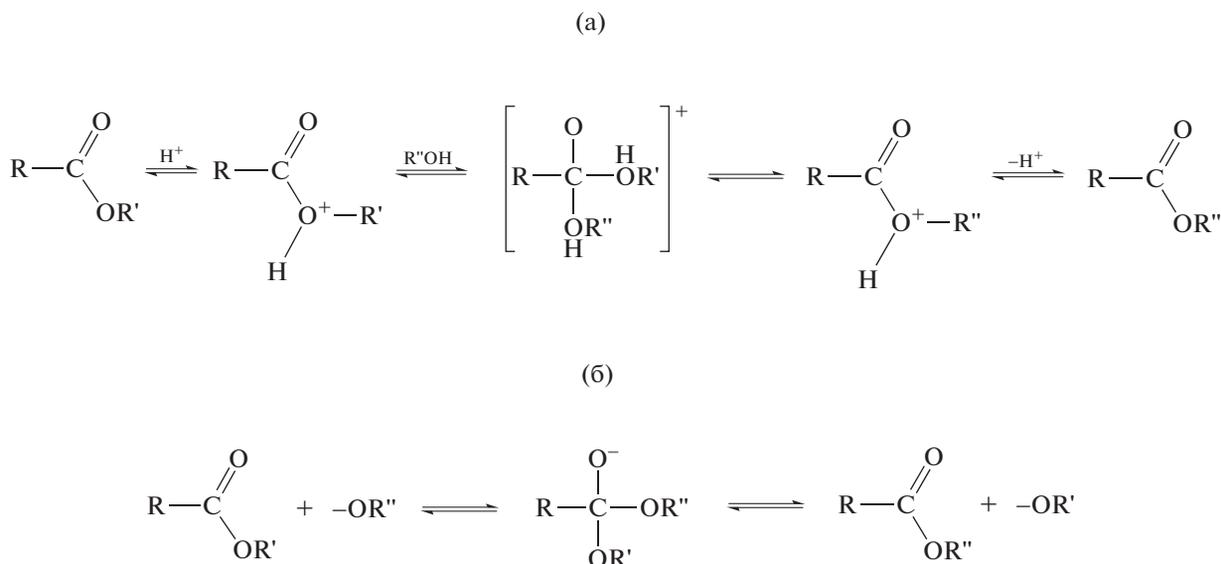


Рис. 1. Общая схема кислотно- (а) и основно-катализируемых (б) реакций дериватизации липидов [18].

пидов – за 10 мин. Более длительного времени требует переэтерификация триглицеридов и сфингомиелина – 30 и 90 мин соответственно [28]. Выход реакции этерификации, выполненной таким образом для биологических объектов, достигает 99% [28, 35]. Применение BF_3 для анализа ПНЖК плазмы крови и мембран эритроцитов описано в работе Вогнилда [36]. Экстракцию липидов проводили по методу Фолча (смесью хлороформа и метанола). Применение трифторида бора для этерификации свободных ЖК, полярных эфиров и триглицеридов возможно в комбинации с гидроксидом натрия. Метод продемонстрировал высокую эффективность при анализе общего содержания ЖК в плазме крови человека и тканях печени крысы. Эффективность этерификации превышает 85% для всех классов липидов [26]. Полученные метиловые эфиры экстрагируют с использованием *n*-гексана (или *n*-пентана) с последующей промывкой водой. Однако, такой способ является достаточно жестким. В целях предотвращения окисления ненасыщенных ЖК реакцию проводят в присутствии антиоксидантов.

В современной практике анализа ПНЖК в качестве антиоксиданта часто используется 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (бутилгидрокситолуол или ВНТ). Одним из недостатков метода является ограничение по срокам и условиям хранения раствора фторида бора [22]. Фторид бора способен реагировать с холестерином с образованием метилового эфира, который мешает дальнейшему анализу компонентов. Необходимо отметить, что используемый в качестве антиоксиданта ВНТ, является весьма токсичным веществом и обладает ярко выраженным канцерогенным действием [37].

Хлорид алюминия (AlCl_3) также используют при определении жирнокислотного состава липидов. Этот реагент может быть использован для прямого метилирования (без предварительной экстракции жиров). По способности переэтерификации AlCl_3 сравним с фторидом бора. Преимуществом метода является меньшее содержание мешающих хроматографическому анализу продуктов. Недостаток – неспособность метилировать свободные ЖК [25].

Для прямого метилирования возможно также применение ацетилхлорида (CH_3COCl). Его добавляют в пробу без предварительной подготовки с последующей экстракцией метиловых эфиров *n*-гексаном или *n*-пентаном. Система метанол-ацетилхлорид применима для дериватизации широкого спектра липидов, при этом ацетилхлорид отличается более высокой эффективностью дериватизации по сравнению с соляной кислотой и фторидом бора [38].

Растворы соляной или серной кислот в метаноле, как и BF_3 , быстро метилируют свободные ЖК и могут быть использованы для переэтерификации всех классов липидов, содержащихся в биологическом материале, в том числе, например, в плазме крови человека [39, 40], мышцах и печени животных [41]. Реакцию обычно проводят при 60–70°C в течение часа.

Одним из общих недостатков кислотных катализаторов является способность конвертировать плазمالогены, присутствующие в биологических образцах, в диметилацетали, которые могут затруднять хроматографическое разделение метиловых эфиров ЖК [42]. Следует отметить, что диметилацетали можно отличить от жирных кислот

по масс-спектрам, поэтому их присутствие не мешает анализу при использовании масс-спектрометрического детектирования.

Основно-катализируемые реакции. Эти реакции (рис. 1б) проходят в более мягких условиях. Наиболее часто применяемыми способами дериватизации являются получение алкильных производных (метиловых, этиловых и изопропиловых) в результате взаимодействия растворов алкоголятов щелочных металлов в соответствующих спиртах. Классическим и наиболее распространенным способом в клинической практике, микробиологии и анализе пищевых продуктов является метилирование [40, 43].

Для щелочного трансметилирования наиболее часто используют растворы метилата натрия (CH_3ONa) или гидроксида калия (KOH) в метаноле. Реакция с метилатом происходит достаточно быстро даже при комнатной температуре, поэтому нет необходимости в использовании антиоксидантов [31]. Особенностью этого основно-катализируемого метода дериватизации является отсутствие модификации свободных кислот и сфинголипидов в метиловые эфиры. Тем не менее, CH_3ONa эффективно используется для трансметилирования липидов крови человека и мышечной ткани [31, 44]. Применение раствора KOH в метаноле для трансметилирования липидов предотвращает реакции изомеризации двойных связей в молекулах ненасыщенных кислот и образование метокси-артефактов [45, 46]. В обоих случаях не происходит высвобождение диметилацеталей из плазмалогенов, которые могут помешать хроматографическому определению.

Реже для щелочной этерификации используют производные аммония, например гидроксид тетраметиламмония (**ТМАН**), гидроксид триметилфениламмония (**ТМРАН**) и др. [47]. Связанные ЖК переходят в соли аммония, которые подвергаются пиролизу с получением метиловых эфиров в испарителе газового хроматографа. Преимущество этого способа заключается в том, что реакция проводится при комнатной температуре, в одну стадию без предварительной экстракции [48].

Известны способы метилирования ЖК с использованием диазометана (рис. 2) и алкилхлорформатов [49]. Для метилирования ЖК может быть использован йодметан (CH_3I). Этот метод был применен для определения состава сфинголипидов [50] и свободных ЖК в мозговой ткани. Кроме получения метиловых производных липидных соединений применяют этерификацию до этил-, пропил-, изопропил-, бутил- и изобутилпроизводных [51].

Описаны методы этерификации ЖК до метиловых эфиров непосредственно в биоматериале (плазме крови, эритроцитах, тканях) без предварительной экстракции липидной фракции [30]. В

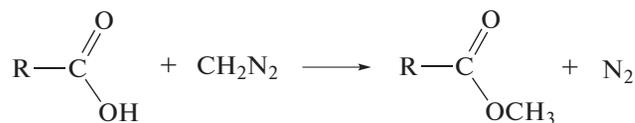


Рис. 2. Дериватизация жирных кислот диазометаном [18].

этом случае не требуются такие стадии пробоподготовки, как, например, отгонка растворителя или центрифугирование, что позволяет избежать потерь в определяемых компонентах и значительно сократить время анализа. Производные, полученные после экстракции *n*-гексаном (или *n*-пентаном) и промывки водой, подвергают хроматографическому анализу.

В некоторых исследованиях приведены методы построения метаболических профилей ЖК с последовательным применением разных дериватизирующих агентов [52].

В целом, одним из главных недостатков метилирования является относительно длительное время реакции и высокая температура, что может способствовать изменению структуры определяемых кислот.

Разделение производных ЖК обычно проводят на капиллярных колонках с неподвижной фазой разной степени полярности. Среди неполярных неподвижных фаз распространены диметилполисилоксан и фенилметилполисилоксан. Часто для анализа метиловых эфиров жирных кислот (**МЭЖК**) используются полярные капиллярные колонки с неподвижной фазой на основе полиэтиленгликоля (**ПЭГ**) [18]. Это связано с тем, что капиллярные колонки с ПЭГ эффективно разделяют эфиры с изомерией углеродного скелета и кратных связей. Наиболее серьезным ограничением для ПЭГ-фазы является низкая разрешающая способность для пространственных изомеров, которые элюируются одновременно. Таким образом, эти колонки не пригодны, если требуется разделение специфичных *цис*-, *транс*-изомеров ЖК при использовании пламенно-ионизационного детектора. Дополнительную эффективность могут обеспечить капиллярные колонки с высокополярной (например, цианополисилоксановой) неподвижной фазой. Методика определения МЭЖК с использованием капиллярной колонки с цианопропильным покрытием предложена специалистами по ГХ компании "Agilent Technologies" (США). Методика позволила провести полное разделение 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК, а использование водорода в качестве газа носителя позволило сократить время анализа до 18 мин [53].

Информацию о химической структуре анализируемых ЖК получают с помощью масс-спек-

трометрических (МС) детекторов. Предел обнаружения МС сравним с пределом обнаружения пламенно-ионизационного детектора. В практике анализа ЖК методом ГХ-МС помимо метилирующих агентов, для дериватизации ЖК используются и другие реагенты. Такими реагентами могут быть, например, N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA) [54], N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил) трифторацетамид (MTBSTFA) [55]. При реакции с MTBSTFA получают сложные эфиры трет-бутилдиметилсилила (TBDMS), преимущества которых состоят в высокой стабильности и образовании очень интенсивных пиков характеристических ионов при фрагментации и, следовательно, легко интерпретируемых масс-спектров. С использованием этого дериватирующего агента разработан метод для одновременного определения ЖК и стероидов в биологических жидкостях. Методика была успешно применена для количественного определения 18 ЖК и некоторых стероидов включая прекурсоры холестерина в образцах слюны человека. Помимо этого методика подходит для анализа таких объектов, как моча, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость и может быть весьма перспективна в клинической практике [55]. Довольно мягкий способ дериватизации – реакция с бис(пентафторфенил)диметилсиланом – длится всего 15 мин. и проходит при комнатной температуре [56]. Для определения короткоцепочечных жирных кислот, являющихся маркерами многих метаболических заболеваний, предложена методика дериватизации пентафторбензилбромидом (PFBBr). При помощи этого метода определяли короткоцепочечные линейные и разветвленные жирные кислоты в фекалиях мышей. Оптимальное время реакции составило 90 мин при температуре 60°C и pH 7. Методика позволила одновременно обнаружить 8 основных короткоцепочечных ЖК с пределом обнаружения 0.244–0.977 мкмоль [57].

При определении ЖК методом ГХ-МС возможна дериватизация 3-пиридилкарбинолом с получением пиколиниловых эфиров. Спектры пиколиниловых эфиров ЖК весьма информативны, содержат интенсивные пики молекулярных ионов, позволяют достоверно определить структуру углеродной цепи кислот и положение кратных связей.

Применение этого способа дериватизации для экспрессного профилирования жирных кислот в бактериальных клетках описано в работе Куркевича с соавторами. Описанный ими метод интересен тем, что авторы использовали пиролизер в качестве термохимического микрореактора для дериватизации. Вкратце, аликвоту (5 мкл) суспензии бактериальных клеток в ацетоне помещали на термоэлемент пиролизера. Сразу после этого добавляли 1 мкл дериватирующей смеси (10% водный раствор гидроксида натрия и 5% пи-

ридилкарбинола), и растворители выпаривали в токе азота. Термоэлемент помещали в пиролизер по точке Кюри и проводили пиролитическую газовую хроматографию (метод исследования при котором образец подвергают пиролизу, а образовавшиеся летучие продукты разделяют в газовом хроматографе) с масс-спектрометрическим детектированием [58]. Температуры, при которых проводят разделение пиколиниловых эфиров, примерно на 50°C выше чем те, которые используют для разделения МЭЖК, так как они имеют более низкую летучесть. Необходимо отметить, что хроматографическое разделение этих производных характеризуется худшим разрешением по сравнению с методами разделения метиловых эфиров [59].

Высокоспецифичным масс-спектром обладают также производные ЖК 4.4-диметилноксазолина (DMOX). Способность к разделению у них сходна с метиловыми эфирами соответствующих кислот [60]. В случае применения пентафторфенилдиметилсилила для дериватизации предел обнаружения можно понизить до 0.05 нг/мл [61].

Жидкостная хроматография. Одним из альтернативных направлений в анализе липидов является ВЭЖХ [18]. Основное преимущество ВЭЖХ над ГХ заключается в большей чувствительности и более высокой селективности, что обусловлено разнообразием неподвижных фаз ВЭЖХ колонок. Недостатком ВЭЖХ для анализа липидов является длительность разделения и высокий расход органических растворителей.

Одна из сложностей анализа ЖК при использовании ВЭЖХ заключается в низком поглощении ими излучения в ближнем ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, что затрудняет их прямое детектирование с помощью УФ детекторов или флуоресцентного детектора. В случае работы с этими наиболее распространенными в ВЭЖХ типами детекторов, перед анализом необходима дериватизация для введения сильных хромофорных УФ-поглощающих групп в молекулы ЖК. Дериватирующими агентами для этого могут служить 2-бромацетофенон [62], 9-флуоренилметилхлорформиат [63], 2-нитрофенилгидразин [64].

Описан метод определения жирных кислот в семенах масличных культур с помощью флуоресцентного детектора с предколоночной дериватизацией 9-флуоренилметилхлороформиатом. Реакция дериватизации проводилась при 60°C в течение всего 10 мин. Хроматографическое разделение 14 жирных кислот (C10–C22) было достигнуто за 30 мин. Использовались длины волн возбуждения и излучения 265 и 315 нм соответственно. Метод показал хорошую чувствительность и воспроизводимость: пределы обнаружения – 0.01–0.05 мкг/мл, относительные стандартные отклонения – менее 0.27%. Этот метод был применен для количе-

ственного определения жирных кислот в кунжутном масле [63].

Дериватизация не требуется в случае применения детекторов, отклик которых не зависит от оптических свойств образца, например, детектора по светорассеянию (Evaporative Light Scattering Detector – **ELSD**). Этот детектор совместим с широким спектром растворителей, что обеспечивает некоторую гибкость при разработке методик. **ELSD** подходит для обнаружения $C_{12}C_{22}$ кислот. Кислоты с более короткой цепью слишком летучие для их уверенного детектирования таким способом [65].

Большинство разделений проводят на обратной фазе с использованием колонок с октадецилсиликагелем (**ODS**, **C18**). Реже используются **C30** и **C8** фазы [50]. Фаза **C8** в большей степени подходит для определения более полярных липидов, например фосфолипидов и короткоцепочечных насыщенных **ЖК** [66].

Хиральные неподвижные фазы, например, 3,5-динитробензоил фенилглицин (**DNBPG**) “Merck KGaA” (Германия), используют для разделения продуктов перекисного окисления липидов [67], разделения энантимеров **ЖК** [68].

Широко распространенной группой методов в липидомике является **ВЭЖХ** в сочетании с масс-спектрометрией [69–71]. В последние десятилетия технический прогресс привел к существенному усовершенствованию **ВЭЖХ-МС**-систем, что позволило повысить чувствительность и селективность приборов. С помощью этих методов могут быть проанализированы все основные классы липидов крови человека (стерины, сложные эфиры холестерина, фосфохолины, фосфозаноламины, сфингомиелины, триацилглицерины, **ЖК**, лизофосфохолины и диацилглицерины), возросла скорость анализа, уменьшилось время на подготовку проб.

Среди методов ионизации, обычно используемых в **ВЭЖХ-МС**, наиболее популярны ионизация электрораспылением (**ESI**) и химическая ионизация при атмосферном давлении (**APCI**).

Для экстракции липидов из биологических матриц перед анализом методом **ВЭЖХ-МС** для экстракции обычно пользуются методом Фолча или Блайя–Дайера, которые считаются эталонными. Также для этой цели применяют смеси метил-трет-бутилового эфира (**МТБЭ**) и метанола, гексана и изопропанола, бутанола и метанола. Все эти методы экстракции демонстрируют различную степень эффективности извлечения для разных классов липидов. Известны методики анализа липидов с одностадийной экстракцией, например метанолом [72]. Метанол обладает высокой экстрагирующей способностью в отношении фосфолипидов и лизофосфохолинов. Помимо этого он вызывает денатурацию белков крови,

которые затем легко удалить центрифугированием, а супернатант может быть непосредственно введен в **ВЭЖХ-МС** систему без дополнительной очистки. В силу своей простоты этот метод обладает очень высокой воспроизводимостью.

В литературных источниках описаны и более универсальные способы одностадийной экстракции, например с использованием смеси метанола, хлороформа и **МТБЭ** в соотношении 1.3 : 1 : 1 [73]. Соотношение объемов образца (100 мкл плазмы крови) и экстрагирующей смеси – 1 : 20. Экстракцию проводили в 5 мл пробирке Эппендорфа. Образцы встряхивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем повторно встряхивали и центрифугировали при 2000 оборотов в течение 10 мин. Верхний слой экстрагента подвергали хроматографированию без дополнительной очистки. Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Agilent 1290 “Agilent Technologies” (США) на фазе **C18** (колонок Zorbax Eclipse Plus RRHD 2.1 × 150 мм, 1.8 мкм “Agilent Technologies” (США)). В качестве элюента применяли 5 мМ раствор формиата аммония в воде, в ацетонитриле и в изопропаноле. Разделение было выполнено при температуре 40°C. Детектирование проводили на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6540 “Agilent Technologies” (США) в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре – 4000 В) с азотом в качестве газа-осушителя (температура – 250°C, скорость потока – 8.8 л/мин). Напряжение на фрагменторе, конусе, скиммере, и октаполе – 110, 500, 65, и 750 В, соответственно. Скорость сканирования – 2 ГГц. При таких условиях удалось обеспечить наилучшее соотношение сигнал/шум для стандартных образцов основных классов липидов, которые в режиме положительной ионизации были детектированы преимущественно в виде аддуктов состава $[M + H]^+$. Еще более высокой чувствительности для **ЖК** (в виде аддуктов $[M - HCOO]$) удалось добиться в отрицательном режиме. Описанный метод экстракции обеспечивал близкую к 100% степень извлечения для девяти основных классов липидов крови человека [73].

Качественно нового уровня в нецелевой липидомике позволяет достичь сочетание **ВЭЖХ** с масс-спектрометрами высокого разрешения. В последнее время благодаря очень высокой разрешающей способности и точности для исследования липидных профилей все чаще используются масс-анализаторы ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (**ИЦР/ПФ**). Например, в работе Ху с соавторами [74] предложен метод **ВЭЖХ-ИЦР/ПФ** для определения липидов в плазме крови человека и мыши. Хроматографическое разделение проводили на фазе **C8** с поверхностно-пористыми частицами сорбента в градиентном режиме. В качестве элюента исполь-

зовали смеси ацетонитрил–вода (60 : 40) и изо-пропанол–ацетонитрил (90 : 10). В одном цикле ВЭЖХ-ИЦР/ПФ было обнаружено более 160 липидов, относящихся к восьми различным классам. Метод был полностью валидирован. Предел обнаружения методики – 0.08–1.28 мкг/мл плазмы, стандартное отклонение воспроизводимости – 2.7–7.9%.

В работе Корц [75] для определения 6 ПНЖК, 14 эйкозаноидов и 3 окисленных метаболитов применяли осаждение белков и онлайн твердофазную экстракцию в сочетании с тандемным МС-детектированием. Разделение компонентов пробы проводили на фазе С18. Для точной идентификации соединений были подобраны специфические MRM-переходы (MRM – мониторинг множественных реакций). Предложенный метод отличается быстрой автоматизированной пробоподготовкой. Пределы обнаружения составили 200–1000 нг/мл для ПНЖК и 10–1000 пг/мл для их метаболитов.

В практике ВЭЖХ анализа липидов описаны методы дериватизации диметиламиноэтанолом. Например, в работе Петтинелла с соавторами [76] было предложено проводить определение ЖК в тканях атеросклеротических бляшек после их удаления с внутренней стенки артерии. Для этого сначала проводили экстракцию ЖК из матрицы с помощью смеси хлороформа и метанола, а затем полученную смесь гидролизовали с помощью 40% гидроксида калия. Далее проводили дериватизацию свободных ЖК деанолом (диметиламиноэтанол или DMEA), с добавлением йодметана. Полученные триметиламиноэтиловые эфиры ЖК определяли методом ВЭЖХ/МС-МС. Пределы обнаружения составили 4–40 нг/мл.

В настоящее время анализ липидов с помощью ВЭЖХ-МС – один из наиболее эффективных подходов для исследования самых разнообразных биологических объектов, в том числе плазмы крови и других биологических жидкостей. По совокупности таких характеристик, как чувствительность, селективность и точность определения, жидкостная хромато-масс-спектрометрия является непревзойденной техникой физико-химического анализа. Альтернативой является газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС), которая по-прежнему играет важную роль в липидомике. Однако методы липидного профилирования на основе ГХ-МС обычно требуют длительных процедур гидролиза и дериватизации, что может быть источником дополнительной погрешности при количественном определении. При этом для анализа неполярных липидов предпочтительнее использовать ГХ-МС.

Сверхкритическая флюидная хроматография. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) – вид хроматографии, в котором подвиж-

ной фазой служит сверхкритический флюид, – вещество при температуре и давлении выше критической точки. Свойства веществ в сверхкритическом состоянии являются промежуточными между их свойствами в газовом и жидком агрегатном состоянии. Например, при плотности близкой к плотности жидкости, они обладают гораздо более высокими коэффициентами диффузии и значительно меньшей вязкостью. Отсутствует поверхностное натяжение. В то же время их растворяющая способность намного выше, чем у газов. Контролируя температуру и давление флюида, можно в широком диапазоне изменять его свойства.

Первое упоминание об использовании сверхкритического флюида в хроматографии относится к 1962 г. Метод описан немецким химиком Клеспером [77]. Тогда он получил название “газовая хроматография высокого давления”. СФХ имеет ряд преимуществ перед ГХ и ВЭЖХ. Низкая вязкость позволяет использовать более длинные (и, соответственно, более эффективные) колонки и работать с более высокими скоростями потоков; хроматографы совместимы практически с любым типом детектора, включая, например, пламенно-ионизационный, что невозможно в ВЭЖХ. Немаловажным является экологичность, так как углекислый газ, который наиболее часто используется в качестве элюента в СФХ, не токсичен в отличие от таких растворителей, как метанол и ацетонитрил, обычно используемых в жидкостной хроматографии. В отличие от ГХ возможно разделение термолабильных и нелетучих веществ.

Такое сочетание свойств позволяет анализировать ЖК без дериватизации, поскольку не требуется обеспечивать летучесть образца, как в случае с ГХ, и не нужно вводить в молекулы аналитов хромофорные группы, как при ВЭЖХ с УФ-детектированием [78]. Следует отметить, что СФХ-систему гораздо проще сочетать с масс-селективными детекторами, так как поток подвижной фазы заметно меньше, чем в ВЭЖХ. Как и в случае ВЭЖХ-МС для ионизации предпочтительно применять электроспрей и химическую ионизацию при атмосферном давлении [79]. Также в отличие от ВЭЖХ СФХ позволяет использовать более высокие скорости потока при более низком давлении, что позволяет достичь большей эффективности и, соответственно лучшего разрешения, и одновременно сократить время анализа.

Современным трендом в СФХ-анализе биологических объектов и, в частности в липидомике, является развитие многомерной хроматографии. В многомерной хроматографии проба последовательно разделяется на двух колонках разной длины и с разными неподвижными фазами [18, 80]. Впервые применение двумерной СФХ для анали-

за жиров описано Хиратой в 2004 г. [81]. В работе выполнено разделение метиловых эфиров ЖК с помощью системы СКФ × СКФ с насадочными колонками и пламенно-ионизационным детектором. Первая колонка с силикагелем (150 × 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) работала при постоянном давлении 13 МПа при 20°C и обеспечила разделение по количеству кратных связей. Вторая колонка с октадецилсиликагелем (50 × 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) работала при постоянном расходе (3 мл/мин) при 50°C. Удерживание на второй колонке возрастало с ростом длины углеродной цепи, однако несколько сокращалось при увеличении количества кратных связей, что, вероятно, связано с некоторым увеличением полярности аналитов. Эта система позволяла добиться очень высокого разрешения и простой идентификации минорных компонентов пробы.

Высокой степени ортогональности позволяет добиться сочетание СФХ и обращено-фазовой жидкостной хроматографии ОФ-ВЭЖХ [82]. Применение подобной системы описано для анализа триглицеридов рыбьего жира [83]. На первом измерении разделение фенациловых эфиров ЖК происходило на фазе, модифицированной серебром. Фазы с закрепленными ионами переходных металлов, в частности серебра, чрезвычайно селективны по отношению к соединениям с кратными связями. В качестве элюента использовали углекислый газ с ацетонитрилом и изопропанолом в качестве модификаторов. На втором измерении разделение происходило на фазе C18 (колонка Zorbax SB C18 50 × 4.6 мм, с размером частиц сорбента 3.5 мкм) с градиентным элюированием водой и ацетонитрилом. Комбинация СФХ × ОФ-ВЭЖХ обеспечила значительно более высокую пиковую емкость главным образом за счет высокой степени ортогональности, основанной на насыщенности и гидрофобности.

Несмотря на все преимущества, СФХ в настоящее время не получила широкого распространения. В первую очередь это связано со сложностью аппаратного исполнения СФХ систем. Поскольку жидкости обладают очень низкой сжимаемостью, их плотность почти постоянна независимо от давления. Сверхкритические флюиды, напротив, очень сжимаемы и их физические свойства существенно изменяются с изменением давления при движении через колонку. Для поддержания постоянного давления (даже при изменении расхода элюента) в системе требуются регуляторы обратного давления, которые очень сложны технически. Помимо этого для изготовления прокладок и уплотнительных колец необходимы специальные материалы, устойчивые к действию сверхкритической жидкости

Перспективы дальнейшего развития СФХ связаны с разработкой новых типов сорбентов, что позволит осуществлять разделение специфических аналитов и расширить область применения СФХ на ранее недоступные для этого метода задачи. Развитие методов динамического модифицирования может гибко регулировать свойства подвижной и стационарной фаз и обеспечить возможность одновременного анализа различных липидов с широким диапазоном полярностей. Большой потенциал в качестве комплексного и высокопроизводительного метода профилирования липидов имеет внедрение хроматографических систем с возможностью автоматической сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ). Это позволит осуществлять извлечение аналитов из объектов исследования значительно эффективнее и быстрее, уменьшить расход реактивов и, следовательно, сократить время анализа и существенно снизить его стоимость.

Капиллярный электрофорез. Альтернативой хроматографическим методам анализа липидов является капиллярный электрофорез (КЭ). Метод основан на разделении заряженных компонентов пробы в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Разделение происходит в кварцевом капилляре, предварительно заполненном электролитом (подходящий буферный раствор). После подачи высокого напряжения (до 30 кВ) к концам капилляра компоненты смеси начинают двигаться с разной скоростью, в зависимости от их заряда и ионного радиуса и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Разделение характеризуется очень высоким разрешением, для анализа требуется небольшое количество пробы – обычно объем анализируемого раствора составляет порядка 2 нл. Детектирование аналитов при капиллярном электрофорезе может осуществляться различными способами. Наиболее распространено фотометрическое детектирование в ультрафиолетовой или видимой области и лазерная флуоресценция. Вполне допустимо сочетание систем капиллярного электрофореза с масс-спектрометрами.

Капиллярный электрофорез традиционно использовали для определения высокомолекулярных биомолекул, однако в последнее время возросла его роль в анализе низкомолекулярных органических веществ. В начале 21 века КЭ начали применять для исследования трансжиров в пищевых продуктах [84].

Для разработки эффективного метода КЭ необходимо принять во внимание несколько аспектов. Важным этапом анализа является оптимизация электрофоретических и аналитических параметров: концентрации и рН фонового электролита, типа и концентрации буферных добавок (поверхностно-активные вещества, органические раство-

рители, циклодекстрины), приложенного напряжения, температуры системы. В первую очередь нужно подобрать рН. Поскольку значения констант кислотности (рКа) ЖК составляет приблизительно 5.0, обычно используют электролиты с рН выше 7.0, чтобы перевести аналиты в анионную форму.

Классическая разновидность КЭ – капиллярный зонный электрофорез – ограниченно применима для определения ЖК из-за плохой растворимости Аналитов в воде и низкого УФ-поглощения аналитов. Водные электролиты допустимо использовать для разделения кислот с длиной цепи C_2 – C_{14} . Как и в случае ВЭЖХ, для фотометрического детектирования возможно введение в молекулы ЖК хромофорных групп, например, дериватизация ω -бромацетофеноном для получения фенациловых эфиров ЖК [85].

Для соединений, слабо поглощающих излучение в УФ-диапазоне, в практике КЭ существует возможность регистрации методом косвенного (непрямого) детектирования. В этом случае в фоновый электролит вводят небольшое количество вещества, хорошо поглощающего излучение требуемой длины волны, подвижность которого близка к подвижности разделяемых веществ. В случае определения анионов поглощающий ион также должен быть анионом, а при определении катионов – катионом. Чаще всего используют катионы ароматических аминов или гетероциклические соединения. Количество добавки должно быть мало для сохранения постоянной ионной силы ведущего электролита в процессе разделения. В зоне, где находится непоглощающий ион, уменьшается концентрация поглощающего иона, и на электрофореграмме регистрируются отрицательные пики, площади которых пропорциональны концентрациям определяемых ионов. Косвенное детектирование позволяет регистрировать все присутствующие в пробе компоненты, то есть является универсальным способом детектирования.

Наиболее распространено в практике анализа ЖК с помощью капиллярного электрофореза использование системы с неводным буферным электролитом и косвенным детектированием. Например, предложен метод разделения различных смесей насыщенных и ненасыщенных свободных ЖК с использованием аденозинмонофосфата (АМФ) в качестве хромофора. Преимущество этого реагента в том, что он имеет высокую молярную поглощающую способность, большое отношение фонового поглощения к фоновому шуму, растворим как в водных, так и в неводных средах [85].

В работе Хаддадиана с соавторами [86] разделение кислот C_{12} – C_{31} было проведено с использованием электролита, содержащего N-метилформамид и диоксан в соотношении 3:2, 40 мМ 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диола

(ТРИС), 2.5 мМ АМФ и 0.5% лаурилового эфира полиоксиэтилена (Brj 35) за 40 мин. Смесь 13 насыщенных и ненасыщенных изомеров C_{14} – C_{22} ЖК была разделена до базовой линии за 37 мин с использованием смеси N-метилформамид–диоксан–вода в соотношении 5 : 4 : 1.

Косвенное детектирование было успешно применено для анализа фосфолипидов крови [87]. В качестве электролита использован 5 мМ раствор аденозинмонофосфата. Разделение проводили при температуре 25°C и приложенном напряжении 30 кВ. Кислоты разделяли в анионной форме и в виде цвиттер-ионов. Метод очень перспективен для определения фосфолипидов в биологических образцах.

Прямое УФ-детектирование возможно, если аналиты содержат несколько двойных связей в углеродной цепи, что обеспечивает возможность поглощения излучения в интервале от 200 до 250 нм [88]. Например, была предложена методика анализа содержания омега-3 ЖК в яйцах с прямым УФ-детектированием при 200 нм [89]. В исследовании применяли 12 мМ боратный буферный раствор, рН 9.2, содержащий 12 ммоль Brj 35, 17% ацетонитрила и 33% метанола. Рабочие условия: ввод пробы – 25 мбар в секунду, напряжение 27 кВ, температура 27°C, детектирование прямое при 200 нм. Параметры капилляра – 40 см \times 50 мкм \times 375 мкм. Описанная в работе методика имела такие преимущества, как низкая себестоимость, короткое время анализа, отсутствие дериватизации в ходе подготовки проб и простота интерпретации данных.

Основные преимущества – высокая эффективность разделения, недоступная для ВЭЖХ, низкое расход образцов и реагентов, короткое время анализа, простота подготовки образцов (отсутствие дериватизации). К сожалению, КЭ обеспечивает гораздо более низкую чувствительность по сравнению с хроматографическими методами (ВЭЖХ или ГХ), а также худшую воспроизводимость. Таким образом, КЭ представляет собой интересную альтернативу для скрининга ЖК в образцах с высоким содержанием ЖК, например, в растительных маслах, продуктах питания, БАДах.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. ЯМР-спектроскопия – метод исследования вещества, использующий явление ядерного магнитного резонанса. Это один из наиболее совершенных методов качественного анализа, дающий наиболее полную информацию о молекулярном строении химических веществ и реакционной способности молекул, допускающий также количественное определение. Сигнал пропорционален разности в заселенности уровней, которая определяется статистикой Больцмана. Достоинства метода – чувствительность к структурным изменениям, неструктуривность, высокая скорость анализа, возмож-

ность анализа смесей. Особые требования к подготовке образца для проведения ЯМР-анализа сокращают сферы применения или вообще делают невозможным его применение в работе с биоматериалом.

Однако возможен анализ биологических жидкостей и тканей с очень простой подготовкой (жидкость-жидкостная экстракция). Например, в случае липидного анализа плазмы крови, жиры могут быть выделены с помощью процедуры жидкостной экстракции по методу Фолча (смесь CHCl_3 и CH_3OH) и переработаны в дейтерированном хлороформе (CDCl_3) перед анализом. Образцы могут быть проанализированы непосредственно (без экстракции) после добавления равного объема D_2O . ЯМР-анализы проводятся с использованием ЯМР 1H спектроскопии протонного магнитного резонанса (ПМР). Образец плазмы получают центрифугированием [90]. При этом ЯМР 1H является наиболее быстрым способом получения информации, поскольку в сравнении со спектроскопией на ядрах углерода (^{13}C ЯМР-спектроскопия) для получения спектра нужно гораздо меньше времени.

Существуют исследования, в которых описано применение протонного магнитного резонанса для количественного определения ненасыщенных ЖК в тканях животных [91]. Свежие образцы тканей аорты, почек и сердца замораживали с помощью жидкого азота сразу после извлечения. Замороженные ткани взвешивали и гомогенизировали. Липиды экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1) из расчета 20 об./ед. веса ткани (20 мл/г) в течение 20 мин. Затем образцы фильтровали через воронку из пористого стекла. Такой же объем раствора использовали для промывки остатков ткани на фильтре. Фильтрат смешивали с 0.74%-ным раствором KCl (1/5 общего объема фильтрата) для удаления всех нелипидных примесей и оставляли для разделения на ночь. Нижний слой (хлороформный) собирали, отгоняли растворитель в ротаторном испарителе при 30°C . Сухие экстракты перерастворяли в CDCl_3 и использовали для анализа. Спектры ЯМР жирных кислот в экстрактах получены при 200 МГц на спектрометре Varian XL-200 с использованием ширины частотной полосы 5000 Гц, угол поворота вектора намагниченности 60° , время сбора данных 1.64 с, задержка 4 с.

Ввиду сложности матриц биологических объектов, ЯМР часто применяют в сочетании с каким-либо методом разделения, например, ВЭЖХ или ГХ. ЯМР в сочетании с ВЭЖХ незаменим при структурном анализе неизвестных соединений в биологических матрицах. Нужно отметить, что по сравнению с другими методами детектирования (такими как масс-спектрометрия), обычно применяемыми в хроматографии, ЯМР характеризу-

ется более низкой чувствительностью [92]. Низкая чувствительность всегда была основным ограничением ЯМР-спектроскопии. Теоретически ЯМР не имеет предела чувствительности, поскольку чувствительность и разрешение связаны с силой магнитного поля (отношение сигнал-шум увеличивается пропорционально 1.5 степени вектора магнитной индукции). Кроме того, качество полученного спектра вещества может быть улучшено за счет увеличения числа сканирований (времени накопления сигналов). Однако для коммерчески доступных в настоящее время спектрометров пределы обнаружения все еще находятся в диапазоне от низких микромолярных до высоких наномолярных. Помимо этого проблема анализа биологических объектов связана с тем, что чем сложнее молекула органического соединения, тем больше сигналов содержит ее протонный спектр. При этом неизбежно наложение сигналов с близкими химическими сдвигами, что затрудняет расшифровку полученных данных. Увеличение рабочей частоты спектрометра разделяет мультиплетные спектральные линии взаимодействующих протонов, что позволяет получить более информативный спектр, но в то же время удорожает используемое оборудование.

Метод ЯМР является единственно возможным вариантом прямого подтверждения строения молекулы вещества, выделенного из биологического объекта и первоначально идентифицированного методами ГЖХ или ВЭЖХ. ЯМР спектроскопия позволяет наиболее простым способом провести анализ конформаций молекул веществ и типов химических связей всех классов липидов. Другие варианты подтверждения структуры менее информативны. Например, масс-спектрометрия имеет дело с фрагментами молекул, а ИК-спектроскопия позволяет оценить общие представления о наличии в веществе определенных функциональных групп или фрагментов структур молекулы. Таким образом, не смотря на то, что ЯМР спектроскопия определяет строение не измененной молекулы, этот метод является в основном, подтверждающим.

Малая распространенность ЯМР обусловлена высокой эксплуатационной стоимостью по сравнению с масс-спектрометрами и другими распространенными аналитическими инструментами. Помимо этого, метод ЯМР требует очень высокой квалификации операторов, использования растворителей со специальным изотопным составом. Также высокие требования предъявляются к лабораториям, в которых эксплуатируются ЯМР-спектрометры (отсутствие вибраций, изоляцией от магнитных и радиочастотных помех и т.д.). Эти факторы, в дополнение к первостепенной проблеме низкой чувствительности сдерживают применение ЯМР в анализе биологических объектов.

Таблица 1. Сравнение основных методов анализа содержания жирных кислот в биологических образцах

Показатель	Вид анализа				
	ГХ	ВЭЖХ	СФХ	КЭ	ЯМР
Предел обнаружения	0.1 пг/мл–1 нг/мл	10 пг/мл–1000 нг/мл	~1 пг/мл	0.1 мкг/мл	0.1–1 мкг/мл
Чувствительность	Высокая	Высокая	Высокая	Низкая	Низкая
Селективность	Средняя	Высокая	Высокая	Удовлетворительная (в случае непрямого детектирования)	Высокая
Продолжительность анализа	Длительная	Длительная	Короткая	Короткая (~40 мин)	Короткая
Пробоподготовка	Экстракция, дериватизация	Экстракция	Экстракция	Экстракция	Экстракция, перерастворение в дейтерированном хлороформе; добавление равного объема D ₂ O
Необходимость дериватизации	+ (требуется)	+ – (требуется для оптических детекторов)	+ – (требуется для оптических детекторов)	+ – (требуется для оптических детекторов в случае прямого детектирования)	– (не требуется)
Дериватизирующие агенты	Кислоты в метаноле (фторид бора, хлорид алюминия, соляная кислота, серная кислота); ацетилхлорид; метилат натрия; гидроксид калия в метаноле; гидроксид тетраметиламмония, гидроксид триметилфениламмония; диазометан и его производные; алкилхлороформиаты; йодметан; бис-триметилсилил-трифторацетамид; N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил) трифторацетамид; бис-(пентафторфенил) диметилсилан; пентафторбензилбромид	Хлорангидрид нафталинкарбоновой кислоты; фталевый ангидрид; дифеновый ангидрид; 2-сульфобензойный ангидрид; диметиламиноэтанол	Кислоты в метаноле; ω-бромацетофенон	ω-бромацетофенон	–
Продолжительность дериватизации	2–90 мин	30–120 мин	2–90 мин	15 мин	–

Таблица 1. Окончание

Показатель	Вид анализа				
	ГХ	ВЭЖХ	СФХ	КЭ	ЯМР
Температура при дериватизации	25–100°C	25–100°C	60–100°C	100°C	–
Температура в процессе анализа	50–280°C	Комнатная	20–50°C	Комнатная	Комнатная
Детекция	Пламенно-ионизационный детектор, масс-селективный детектор	Ультрафиолетовый детектор; флуоресцентный детектор; детектор по светорассеянию; масс-селективный детектор	Любой вид детектора, в т.ч. пламенно-ионизационный	Фотометрический детектор в ультрафиолетовой или видимой области; лазерная флуоресценция; масс-спектрометрия; косвенная детекция	–
Объем пробы	Маленький	Маленький	Маленький	Очень маленький (~2 нл)	Большой
Расход реагентов	Низкий	Высокий	Низкий	Очень низкий	Высокий

В табл. 1 приведено сравнение рассмотренных в работе методов анализа ЖК.

Обзор литературы, посвященный применению различных методов анализа ЖК в биологических объектах, показал, что все представленные хроматографические методы пригодны для качественного и количественного определения этих соединений. Выбор конкретной методики зависит от многих факторов – типа анализируемого образца, характера матрицы и т.п.

ГХ и ВЭЖХ в сочетании с различными детекторами являются доминирующими по распространенности методами анализа ЖК. Разнообразие детекторов увеличивает гибкость и расширяет сферу применимости этих групп методов к различным типам образцов. Очень перспективен для анализа липидов метод СФХ. Интересную альтернативу хроматографии для скрининга ЖК в различных матрицах представляет собой КЭ.

Применение ЯМР для анализа липидов ограничивается высокой эксплуатационной стоимостью и очень высокими требованиями к квалификации операторов, а также сравнительно низкой чувствительностью.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда по проекту № 19-76-30014 “Фундаментальные исследования паттернов питания человека как основа перспективных технологий производства пищевых продуктов заданного состава и свойств для реализации стратегии здорового питания и профилактики социально значимых заболеваний”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vance J.E., Vance D.E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam: Elsevier, 2008. 639 p.
2. Köfeler H.C. // Encyclopedia of Lipidomics / Ed. M. Wenk. Dordrecht: Springer, 2016. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_21-1
3. van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9. № 2. P. 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
4. Гладышев М.И. // Журн. СФУ. Биология. 2012. Т. 4. № 5. С. 352–386.
5. SanGiovanni J.P., Chew E.Y. // Prog. Retin. Eye Res. 2005. V. 24. № 1. P. 87–138. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>
6. Valera B., Suhas E., Counil E., Poirier P., Dewailly E. // J. Am. Coll. Nutr. 2014. V. 33. № 4. P. 288–296. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.874913>
7. Harris W.S., Mozaffarian D., Rimm E., Kris-Etherton P., Rudel L.L., Appel L.J., Engler M., Engler M., Sacks F. // Circulation. 2009. V. 119. № 6. P. 902–907. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191627>
8. Синуцкая Е.Н., Кокоричева Л.В., Манык Ф.М. // Молодой ученый. 2018. № 50. С. 97–99.
9. Phang M., Lazarus S., Wood L., Garg M. // Semin. Thromb. Hemost. 2011. V. 37. № 03. P. 199–208. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1273084>
10. Plourde M., Cunnane S. // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2007. V. 32. № 4. P. 619–634. <https://doi.org/10.1139/H07-034>
11. Hegele R.A. // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10. № 2. P. 109–121. <https://doi.org/10.1038/nrg2481>

12. *Simopoulos A.P.* // Exp. Biol. Med. 2008. V. 233. № 6. P. 674–688.
<https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>
13. *Ly W., Yang T.* // Clin. Biochem. 2012. V. 45. № 1–2. P. 127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.10.011>
14. *Munir R., Usman H., Hasnain S., Smans K., Kalbacher H., Zaidi N.* // Biochimie. 2014. V. 102. P. 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.010>
15. *Wall R., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C.* // Nutr. Rev. 2010. V. 68. № 5. P. 280–289.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>
16. *Thomas J., Thomas C., Radcliffe J., Itsiopoulos C.* // Biomed Res. Int. 2015. V. 2015. Article ID 172801. 13 p.
<https://doi.org/10.1155/2015/172801>
17. *Bielawska K., Dziakowska I., Roszkowska-Jakimiec W.* // Toxicol. Mech. Methods. 2010. V. 20. № 9. P. 526–537.
<https://doi.org/10.3109/15376516.2010.515081>
18. *Dołowy M., Pyka A.* // J. Chem. 2015. V. 2015. Article ID 120830. 20 p.
<https://doi.org/10.1155/2015/120830>
19. *Wu Z., Zhang Q., Li N., Pu Y., Wang B., Zhang T.* // J. Sep. Sci. 2017. V. 40. № 1. P. 288–298.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201600707>
20. *Tedone L., Costa R., De Grazia S., Ragusa S., Mondello L.* // Phytochem. Anal. 2014. V. 25. № 5. P. 468–475.
<https://doi.org/10.1002/pca.2518>
21. *Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.* Harper's Illustrated Biochemistry. N.Y.: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003. 693 p.
doi.org/10.6.20.12:80/handle/123456789/48617
22. *Shantha N.C., Napolitano G.E.* // J. Chromatogr. A. 1992. V. 624. № 1–2. P. 37–51.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85673-H](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85673-H)
23. *Cruz-Hernandez C., Thakkar S.K., Masserey-Elmelegy I., Buosi W., Fontannaz P., Giuffrida F.* // J. Sep. Sci. 2017. V. 40. № 16. P. 3289–3300.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201700030>
24. *Casal S., Oliveira B.* // Encyclopedia of Chromatography. 3 ed. / Ed. J. Cazes. N.Y.: CRC Press, 2009. P. 833–845.
25. *Eder K.* // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1995. V. 671. № 1–2. P. 113–131.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00142-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00142-6)
26. *Ostermann A.I., Müller M., Willenberg I., Schebb N.H.* // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2014. V. 91. № 6. P. 235–241.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.002>
27. *Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R.* // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 465. № 1–2. P. 39–62
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00397-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00397-5)
28. *Morrison W.R., Smith L.M.* // J. Lipid Res. 1964. V. 5. № 4. P. 600–608.
29. *Bondia-Pons I., Castellote A.I., López-Sabater M.C.* // J. Chromatogr. B. 2004. V. 809. № 2. P. 339–344.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.002>
30. *Araujo P., Nguyen T.T., Frøyland L., Wang J., Kang J.X.* // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1212. № 1–2. P. 106–113.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.006>
31. *Murrieta C.M., Hess B.W., Rule D.C.* // Meat Sci. 2003. V. 65. № 1. P. 523–529.
[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00244-9)
32. *Thomas M.L., Brown Jr A.H., Kellogg D.W., Rule D.C., Baublits R.T., Johnson Z.B., Anschutz K.S., Murrieta C.M.* // J. Food Qual. 2008. V. 31. № 2. P. 189–204.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00190.x>
33. *Mondello L., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 41. № 5. P. 1566–1570.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.027>
34. *Ichihara K., Fukubayashi Y.* // J. Lipid Res. 2010. V. 51. № 3. P. 635–640.
<https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
35. *Lands W.E.M., Libelt B., Morris A., Kramer N.C., Prewitt T.E., Bowen P., Schmeisser D., Davidson M.H., Burns J.H.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis. 1992. V. 1180. № 2. P. 147–162.
[https://doi.org/10.1016/0925-4439\(92\)90063-S](https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90063-S)
36. *Vognild E., Elvevoll E.O., Brox J., Olsen R.L., Barstad H., Aursand M., Østerud B.* // Lipids. 1998. V. 33. № 4. P. 427–436.
<https://doi.org/10.1007/s11745-998-0224-8>
37. *Bauer A.K., Dwyer-Nield L.D.* // Methods in Cell Biology. V. 163. Chapter 10 /Eds. L. Galluzzi, A. Buqué. N.Y.: Academic Press, 2021. P. 151–173.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.07.003>
38. *Vičkačkaitė V., Lingytė A., Kasperovičienė J., Bugelytė B., Koreivienė J., Savadova K.* // Chemija. 2016. V. 27. № 4.
39. *Burdge G.C., Wright P., Jones A.E., Wootton S.A.* // Br. J. Nutr. 2000. V. 84. № 5. P. 781–787.
<https://doi.org/10.1017/S0007114500002154>
40. *Ichihara K., Kohsaka C., Tomari N., Kiyono T., Wada J., Hirooka K., Yamamoto Y.* // Anal. Biochem. 2016. V. 495. P. 6–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.009>
41. *Sampels S., Pickova J.* // Food Chem. 2011. V. 128. № 3. P. 811–819
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.089>
42. *Cruz-Hernandez C., Destailats F.* // Encyclopedia of Lipidomics. / Ed. M. Wenk. Dordrecht: Springer, 2016.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_66-1
43. *Liu Z., Ezernieks V., Rochfort S., Cocks B.* // Food Chem. 2018. V. 261. P. 210–215.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.053>
44. *Akinyemi O., Bruckner G., Johnson J., Lennie T.A., Hildebrand D.* // Open Nutr. J. 2017. V. 11. № 1.
<https://doi.org/10.2174/1874288201711010017>
45. *Delmonte P., Kramer J.K.G.* // Reference Module in Food Science. Amsterdam: Elsevier, 2016.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03051-1>
46. *Juárez M., Polvillo O., Contò M., Ficco A., Ballico S., Failla S.* // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1190. № 1–2. P. 327–332.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.004>
47. *Drechsel D., Dettmer K., Engewald W.* // Chromatographia. 2003. V. 57. № 1. P. S283–S289.
<https://doi.org/10.1007/BF02492117>
48. *Tsai C.J., Liu C.C., Hung L.B., Pan B.S.* // J. Am. Oil Chem. Soc. 2012. V. 89. № 1. P. 9–16.
<https://doi.org/10.1007/s11746-011-1880-2>

49. Gutnikov G. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1995. V. 671. № 1–2. P. 71–89.
https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00116-Z
50. Johnson S.B., Brown R.E. // J. Chromatogr. A. 1992. V. 605. № 2. P. 281–286.
https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85248-R
51. Brondz I. // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 465. № 1–2. P. 1–37.
https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01467-2
52. Dai L., Gonçalves C.M.V., Lin Z., Huang J., Lu H., Yi L., Liang Y., Wang D., An D. // Talanta. 2015. V. 135. P. 108–114.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.039
53. Zou Y., Wu H. // Agilent Technologies Application Note. 2018. № 5991-8706EN. https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-8706EN_37-fattyacid_FAME_application.pdf
54. Tammekivi E., Vahur S., Kekišev O., Van der Werf I.D., Toom L., Herodes K., Leito I. // Anal. Methods. 2019. V. 11. № 28. P. 3514–3522.
https://doi.org/10.1039/C9AY00954J
55. Moon J.Y., Kong T., Jang H., Kang H.C., Cho Y.Y., Lee J., Lee H. // J. Chromatogr. B. 2018. V. 1093–1094. P. 82–90.
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.059
56. Yang Y.J., Choi M.H., Paik M.J., Yoon H.R., Chung B.C. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 2000. V. 742. № 1. P. 37–46.
https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00098-0
57. He L., Proadhan M.A.I., Yuan F., Yin X., Lorkiewicz P.K., Wei X., Feng W., McClain C., Zhang X. // J. Chromatogr. B. 2018. V. 1092. P. 359–367.
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.028
58. Kurkiewicz S., Dzierzewicz Z., Wilczok T., Dworzanski J. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2003. V. 14. P. 58–62.
https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00817-6
59. Wetzel D.L., Reynolds J.E., Christie W.W., Budge I.S., Iverson S., Koopman H. // Mar. Mamm. Sci. 2007. V. 23. № 4. P. 989–992.
https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2007.00158.x
60. Garrido J.L., Medina I. // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 465. № 1–2. P. 409–416.
https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00207-6
61. Choi M.H., Chung B.C. // Anal. Biochem. 2000. V. 277. № 2. P. 271–273.
https://doi.org/10.1006/abio.1999.4407
62. Bodoprost J., Rosemeyer H. // Int. J. Mol. Sci. 2007. V. 8. P. 1111–1124. 10.3390/i8111111
63. Majnooni M.B., Mohammadi B., Jalili R., Babaei A., Bahrani G. // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2016. V. 39. P. 877–881.
https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1275000
64. Shrestha R., Miura Y., Hirano K., Chen Z., Okabe H., Chiba, H., Hui S. // Anal. Sci. 2018. V. 34. P. 575–582.
https://doi.org/10.2116/analsci.17P557
65. Bravi E., Perretti G., Montanari L. // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1134. № 1–2. P. 210–214.
https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.007
66. Suchocka Z., Gronostajska D., Suchocki P., Pachecka J. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. V. 32. № 4–5. P. 859–865.
https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00188-2
67. Garscha U., Nilsson T., Olliv E.H. // J. Chromatogr. B. 2008. V. 872. № 1–2. P. 90–98.
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.07.013
68. Lee S.H., Blair I.A. // BMB Rep. 2009. V. 42. № 7. P. 401.
https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.7.401
69. Ahern K.W., Serbulea V., Wingrove C.L., Palas Z.T., Leitinger N., Harris T.E. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-47693-5
70. Godzjen J., Ciborowski M., Martínez-Alcázar M.P., Samczuk P., Kretowski A., Barbas C. // J. Proteome Res. 2015. V. 14. № 8. P. 3204–3216.
https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00169
71. Reis A., Rudnitskaya A., Blackburn G.J., Fauzi N.M., Pitt A.R., Spickett C.M. // J. Lipid Res. 2013. V. 54. № 7. P. 1812–1824.
https://doi.org/10.1194/jlr.M034330
72. Zhao Z., Xu Y. // J. Lipid Res. 2010. V. 51. № 3. P. 652–659.
https://doi.org/10.1194/jlr.D001503
73. Pellegrino R.M., Di Veroli A., Valeri A., Goracci L., Cruciani G. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 30. P. 7937–7948.
https://doi.org/10.1007/s00216-014-8255-0
74. Hu C., Van Dommelen J., Van Der Heijden R., Spijksma G., Reijmers T.H., Wang M., Slee E., Lu X.Xu G., van der Greef J., Hankemeier T. // J. Proteome Res. 2008. V. 7. № 11. P. 4982–4991.
https://doi.org/10.1021/pr800373m
75. Kortz L., Dorow J., Becker S., Thiery J., Ceglarek U. // J. Chromatogr. B. 2013. V. 927. P. 209–213.
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.012
76. Pettinella C., Lee S.H., Cipollone F., Blair I.A. // J. Chromatogr. B. 2007. V. 850. № 1–2. P. 168–176.
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.023
77. Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A. // J. Org. Chem. 1962. V. 27. P. 700–701.
https://doi.org/10.1021/jo01049a069
78. Taylor L.T. // J. Supercrit. Fluids. 2009. V. 47. № 3. P. 566–573.
https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.09.012
79. Hartmann A., Ganzera M. // Planta Med. 2015. V. 81. № 17. P. 1570–1581.
https://doi.org/10.1055/s-0035-1545911
80. Bernal J.L., Martín M.T., Toribio L. // J. Chromatogr. A. 2013. V. 1313. P. 24–36.
https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.022
81. Hirata Y., Sogabe I. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 378. № 8. P. 1999–2003.
https://doi.org/10.1007/s00216-003-2487-8
82. Svan A., Hedeland M., Arvidsson T., Pettersson C.E. // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1000. P. 163–171.
https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.014
83. François I., Sandra P. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 18. P. 4005–4012.
https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.078
84. de Oliveira M.A.L., Solis V.E., Gioielli L.A., Polakiewicz B., Tavares M.F. // Electrophoresis. 2003. V. 24. № 10. P. 1641–1647.
https://doi.org/10.1002/elps.200305394

85. *de Oliveira M.A.L., Porto B., Faria I., Lopes P., Barra P., Castro R., Sato R.* // *Molecules*. 2014. V. 19. № 9. P. 14094–14113.
<https://doi.org/10.3390/molecules190914094>
86. *Haddadian F., Shamsi S.A., Warner I.M.* // *J. Chromatogr. Sci.* 1999. V. 37. № 4. P. 103–107.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/37.4.103>
87. *Gao F., Dong J., Li W., Wang T., Liao J., Liao Y., Liu H.* // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1130. № 2. P. 259–264.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.070>
88. *Gabriel H., Amelia T.V., Cristina F., Aura R.* // *Acta Marisensis – Seria Medica*. 2015. V. 61. № 4.
<https://doi.org/10.1515/amma-2015-0103>
89. *Porto B.L.S., de Souza M.V.N., de Oliveira M.A.L.* // *Anal. Sci.* 2011. V. 27. № 5. P. 541–541.
<https://doi.org/10.2116/analsci.27.541>
90. *Correia B.S.B., Torrinas R.S., Ohashi W.Y., Tasic L.* // *Advances in Lipid Metabolism*. Chapter 2. /Ed. R.V. Baez. IntechOpen, 2018.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.81523>
91. *Chi Y., Gupta R.K.* // *Am. J. Hypertens.* 1998. V. 11. № 3. P. 340–348.
[https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(97\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(97)00456-1)
92. *Emwas A.H., Roy R., McKay R.T., Tenori L., Saccenti E., Gowda G.A.N. et al.* // *Metabolites*. 2019. V. 9. № 7. P. 123.
<https://doi.org/10.3390/metabo9070123>

Methodological Aspects of Analysis of Fatty Acids in Biological Samples

V. A. Zotov^{a, *}, V. V. Bessonov^a, and D. V. Risnik^a

^a *Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 109240 Russia*

**e-mail: arkont-87@yandex.ru*

The review considers principal methods for determination of fatty acids (FA) in biological objects, as well as less common but promising methods. The advantages, disadvantages and prospects of these methods are described and compared. Special attention is paid to the specificities of the preparation of biological samples, such as the extraction of lipids and derivatization process of fatty acids. The methodological aspects of the determination of fatty acids by gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), the features of the use of various types of stationary phases used for chromatographic separation of FA are considered. The possibilities of using capillary electrophoresis (CE) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) for the analysis of fatty acids are analyzed. Special requirements and limitations of these methods concerning to work with biomaterials are also considered.

Keywords: lipids, polyunsaturated fatty acids, gas chromatography, liquid chromatography, capillary electrophoresis, supercritical fluid chromatography, NMR spectroscopy