СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 1, 2021

Жасмонатный сигналинг и адаптация растений к действию абиотических стрессоров (обзор)

Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястреб 3

Влияние антибиотиков, использующихся в животноводстве, на распространение лекарственной устойчивости бактерий (обзор)

И. С. Сазыкин, Л. Е. Хмелевцова, Е. Ю. Селиверстова, М. А. Сазыкина 24

Влияние структурных особенностей пектина на комплексообразование с лизоцимом

Ю. А. Антонов, И. Л. Журавлёва 36

Характеристика и свойства комплекса протеолитических ферментов тромболитического действия микромицета *Sarocladium strictum*

Е. И. Корниенко, А. А. Осмоловский, В. Г. Крейер, Н. А. Баранова, И. Б. Котова, Н. С. Егоров 46

Кинетические свойства НАДФ$^+$-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы из листьев кукурузы

А. Т. Епринцев, М. О. Гатауллина 54

Антимикробный потенциал алкалофильного гриба *Sodiomyces alkalinus* и отбор штаммов – продуцентов новых антимикотиков

А. Е. Куварина, М. Л. Георгиева, Е. А. Рогожин, А. Б. Кулько, И. А. Гаврюшина, В. С. Садыкова 59

Получение комплексного ферментного препарата с увеличенной пектиназной активностью на основе нового мутантного штамма *T. reesei* Co-44

Е. В. Костылева, А. С. Середа, И. А. Великорецкая, А. М. Айсина, Н. В. Цурикова, Е. А. Рубцова, А. Д. Сатрутдинов, А. П. Синицын 68

Использование левана *Azotobacter vinelandii* в качестве компонента биосорбентов соединений тяжелых металлов и радионуклидов

В. В. Шутова, В. В. Ревин, Е. А. Калинкина, А. В. Сафонов, А. Г. Савченко, Г. В. Максимов 77

Перспективный штамм бактерий *Pseudomonas protegens* для стимуляции роста сельскохозяйственных злаков, устойчивый к гербицидам

С. П. Четвериков, Д. В. Четверикова, М. Д. Бакаева, А. А. Кенджиева, С. Н. Стариков, З. Р. Султангазин 87

Биосенсор на основе послойно иммобилизованных микроорганизмов для определения биохимического потребления кислорода

В. А. Арляпов, Н. Ю. Юдина, А. В. Мачулин, В. А. Алферов, О. Н. Понаморева, А. Н. Решетилов 95

CONTENTS

Vol. 57, No. 1, 2021

Jasmonate Signaling and Plant Adaptation to Abiotic Stresses (Review)
Yu. E. Kolupaev and T. O. Yastreb 3

Influence of Antibiotics Use in Animal Breeding on Dissemination of Bacterial Drug Resistance
I. S. Sazykin, L. E. Khmelevtsova, E. Yu. Seliverstova, and M. A. Sazykina 24

Effect of Structural Features of Pectin on Its Complexation with Lysozyme
Y. A. Antonov and I. L. Zhuravleva 36

Characteristics and Properties of the Complex of Proteolytic Enzymes of the Thrombolytic Action of the Micromycete *Sarocladium strictum*
E. I. Kornienko, A. A. Osmolovskiy, V. G. Kreyer, N. A. Baranova, I. B. Kotova, and N. S. Egorov 46

Kinetic Properties of $NADP^+$-Dependent Decarboxylating Malate Dehydrogenase from Corn Leaves
A. T. Eprintsev and M. O. Gataullina 54

Antimicrobial Potential of the Alkalophilic Fungus *Sodiomyces alkalinus* and Selection of Strains – Producers of New Antimicotics
A. E. Kuvarina, M. L. Georgieva, E. A. Rogozhin, A. B. Kulko, I. A. Gavryushina, and V. S. Sadykova 59

Obtaining of the Complex Enzyme Preparation with Enhanced Pectinase Activity Using a New Mutant Strain *T. reesei* Co-44
E. V. Kostyleva, A. S. Sereda, I. A. Velikoretskaya, A. M. Aisina, N. V. Tsurikova, E. A. Rubtsova, A. D. Satrutdinov, and A. P. Sinitsyn 68

Use of Levan from *Azotobacter vinelandii* as a Component of Biosorbent of Heavy Metals and Radionuclides
V. V. Shutova, V. V. Revin, E. A. Kalinkina, A. V. Safonov, A. G. Savchenko, and G. V. Maksimov 77

Promising Herbicide – Resistant Bacterial Strain Pseudomonas Protegens for Stimulating the Agricultural Cereal Grains Growth
S. P. Chetverikov, D. V. Chetverikova, M. D. Bakaeva, A. A. Kenjieva, S. N. Starikov, and Z. R. Sultangazin 87

A biosensor on the Basis of Microorganisms Immobilized in Layer-by-Layer Films for Determination of Biochemical Oxygen Demand
V. A. Arlyapov, N. Yu. Yudina, A. V. Machulin, V. A. Alferov, O. N. Ponamoreva, and A. N. Reshetilov 95

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 3–23

УДК 577.13:581.1

ЖАСМОНАТНЫЙ СИГНАЛИНГ И АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ (ОБЗОР)

© 2021 г. Ю. Е. Колупаев[1, *], Т. О. Ястреб[1]

[1]Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, 62483 Украина

*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.
После доработки 08.06.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Рассмотрена роль жасмоновой кислоты (**ЖАК**) и жасмонатного сигналинга в регуляции адаптивных реакций растений на действие стрессоров. Кратко описан синтез ЖАК у растений и основной путь трансдукции жасмонатного сигнала. Рассматривается влияние ЖАК на содержание в клетках других сигнальных посредников (ионов кальция, активных форм кислорода, оксида азота, сероводорода и монооксида углерода). Впервые обобщаются данные об участии компонентов жасмонатного сигналинга (в частности, белков COI1 и JIN1/MYC2) в реализации физиологических эффектов сигнальных посредников-газотрансмиттеров. Приводятся сведения об изменении эндогенного содержания ЖАК при действии стрессоров и влиянии экзогенной ЖАК и ее производных на устойчивость растений. Анализируются спектр жасмонатзависимых защитных реакций растений и механизмы их индуцирования. Особое внимание уделяется роли ЖАК в активации антиоксидантной системы и регуляции состояния устьиц в стрессовых условиях.

Ключевые слова: жасмоновая кислота, метилжасмонат, сигналинг, активные формы кислорода, оксид азота, сероводород, монооксид углерода, абсцизовая кислота, адаптивные реакции растений

DOI: 10.31857/S0555109921010281

Формирование адаптивных реакций растений происходит с участием сигнальных посредников и фитогормонов, которые объединены в регуляторную сеть и пребывают в сложном функциональном взаимодействии. Несмотря на стремительное накопление сведений о сигналинге в клетках и организме растений в целом, представления о взаимодействии компонентов сигнальных систем остаются весьма фрагментарными. При этом доступные методические подходы обычно позволяют исследовать лишь отдельные фрагменты сигнальной сети, функционирующие в определенных экспериментальных условиях. Тем не менее, анализ и обобщение таких данных приближает к пониманию механизмов формирования физиологических реакций на те или иные воздействия за счет функциональных связей между сигнальными и гормональными посредниками.

Одной из ключевых групп “стрессовых” фитогормонов являются жасмоновая кислота (**ЖАК**) и ее производные, представленные метилжасмонатом (**Ме-ЖАК**) и конъюгатом жасмоната с изолейцином (**Иле-ЖАК**) [1]. Также значительной физиологической активностью обладает предшественник ЖАК – 12-оксофитодиеновая кислота, сигнальное действие которой перекрывается с ЖАК, но может быть и отличным от ее эффектов [2]. Поскольку ЖАК, ее предшественники и производные являются продуктами липоксигеназного каскада, их рассматривают в ряду представителей оксилипинов – физиологически активных молекул, образующихся из ненасыщенных жирных кислот во всех аэробных организмах [3]. При этом среди многочисленных продуктов данного каскада именно ЖАК и ее производным принадлежит доминирующая роль в силу их наиболее высокой биологической активности и универсального присутствия у всех видов растений – от водорослей до покрытосеменных.

ЖАК интенсивно изучается уже более четверти века [4]. Значительное внимание уделяется ее исследованию как фактора регуляции роста и развития растений [5, 6], а также как сигнала, активирующего экспрессию защитных генов растений в процессе патогенеза [7]. Менее изученными остаются роль и механизмы действия ЖАК при адаптации растений к абиотическим стрессовым факторам. Это касается прежде всего сигнальных посредников, вовлеченных в процессы активации адаптивных реакций растений с участием ЖАК. Несмотря на то, что природа ключевых белков, задействованных в рецепции жасмонатного сигнала и его трансдукции в генетический аппарат в целом известна [8], открытыми

остаются вопросы взаимодействия собственно жасмонатного сигнала с сигналами ключевых клеточных посредников: ионов кальция, активных форм кислорода (**АФК**), оксида азота (**NO**) и других. Актуальность выяснения такого взаимодействия усиливается в связи с расширением спектра сигнальных соединений растительных клеток, в частности, с развитием представлений о роли газотрансмиттеров – сигнальных газообразных молекул [9, 10]. Предметом настоящего обзора явился анализ данных о жасмонатиндуцируемых защитных реакциях растений на действие абиотических стрессоров, реализующихся с участием низкомолекулярных посредников, а также вовлечении компонентов жасмонатного сигналинга в реализацию эффектов других регуляторных молекул.

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О СИНТЕЗЕ ЖАК

В течение последних десятилетий биосинтез ЖАК был достаточно подробно охарактеризован у различных видов двудольных и однодольных растений и описан в ряде специальных обзоров [11–14]. В связи с этим ниже кратко будут изложены основные представления. Синтез ЖАК происходит в результате последовательного превращения непредельных жирных кислот под влиянием ферментов, локализованных в пластидах, пероксисомах и цитоплазме [11].

В ответ на действие внутренних или внешних сигналов фосфолипазы, локализованные в мембранах хлоропластов, отщепляют линоленовую ($C_{18:3}$) кислоту от липидной основы [13]. Под действием 13-липоксигеназы она окисляется до 13-гидропероксилиноленовой кислоты [12]. Последняя дегидрируется алленоксидсинтазой с образованием 12-оксофитодиеновой кислоты (**12-ОФДК**) – первого пентациклического производного октадекатриенового пути. До недавнего времени было неизвестно, как 12-ОФДК поступает в пероксисомы, где проходят заключительные стадии синтеза ЖАК. В настоящее время считается, что 12-ОФДК транспортируется в пероксисомы с помощью так называемого АТФ-связывающего кассетного белка-транспортера CTS [15]. Нарушение импорта 12-ОФДК из цитозоля у мутантов по гену этого белка *cts* приводит к повышению содержания этой сигнальной молекулы в цитозоле и активации самостоятельного сигнального пути 12-ОФДК [16]. В то же время, поскольку у растений этого генотипа синтез ЖАК, хотя и в меньших количествах, происходит, считают возможным и попадание 12-ОФДК в пероксисомы путем пассивной диффузии [15].

После поступления в пероксисомы 12-ОФДК превращается 12-ОФДК-редуктазой в 12-оксофитоеновую кислоту. Синтез ЖАК происходит в результате трех реакций β-окисления 12-оксофитоеновой кислоты, которые катализируются тремя различными ферментами: ацил-КоА-оксидазой, так называемым мультифункциональным белком и 3-кетоацил-КоА-тиолазой [17].

Синтезированная в пероксисомах ЖАК высвобождается в цитоплазму, где может превращаться в более чем 30 различных активных и неактивных производных, в зависимости от химической модификации карбоксильной группы, боковой цепи пентенила или пентанонового кольца [5]. Среди ряда метаболитов свободной ЖАК основными биологически активными формами считаются *цис*-жасмон, Ме-ЖАК и Иле-ЖАК [5, 13]. *Цис*-жасмон образуется путем декарбоксилирования ЖАК [18]. Летучий Ме-ЖАК синтезируется с помощью карбоксилметилтрансферазы ЖАК [19]. Иле-ЖАК образуется под влиянием JAR1-синтазы (jasmonate amino acid synthetase) [20]. Именно Иле-ЖАК необходим для дальнейшей передачи сигналов ЖАК [5].

КАНОНИЧЕСКИЙ ПУТЬ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ЖАСМОНАТА

В цитоплазме растительных клеток наиболее биологически активной формой жасмонатов является Иле-ЖАК [5, 21]. Именно эта форма жасмоната транспортируется в ядро [5]. Следует также отметить изученные эффекты транспорта Иле-ЖАК и Ме-ЖАК на большие расстояния через сосудистые пучки и/или передачу по воздуху [5, 22, 23]. Ме-ЖАК рассматривается в качестве мобильного сигнала, обеспечивающего контакты между частями растения, отдельными растениями, а возможно, и взаимодействие растений разных видов [7]. Высокая летучесть Ме-ЖАК и его способность легко проникать через мембраны была установлена еще 30 лет тому назад [24]. Считается, что Ме-ЖАК может быть “сигналом тревоги” для соседних с испытавшими действие стрессора клеток растений. При этом Ме-ЖАК, поступивший в клетки растений, гидролизуется, и образующаяся ЖАК превращается в Иле-ЖАК. В целом, эффекты системной передачи жасмонатного сигнала у растений рассматриваются в основном в контексте формирования их устойчивости к патогенам.

В отсутствие действия на растения стресс-факторов или других стимулов содержание Иле-ЖАК низкое, в связи с чем транскрипционные факторы жасмонатного сигналинга находятся в репрессированном состоянии [5]. Под влиянием стрессоров или иных стимулов усиливается образование ЖАК и ее превращение в Иле-ЖАК в цитозоле с последующим транспортом этого конъюгата в ядро (рис. 1). Недавно установлено, что у *Arabidopsis thaliana* субклеточная локализация ЖАК регулируется с помощью белка-переносчика AtJAT1 [15, 25]. Этот белок переносит Иле-ЖАК через ядерную мембрану. Помимо этого, он

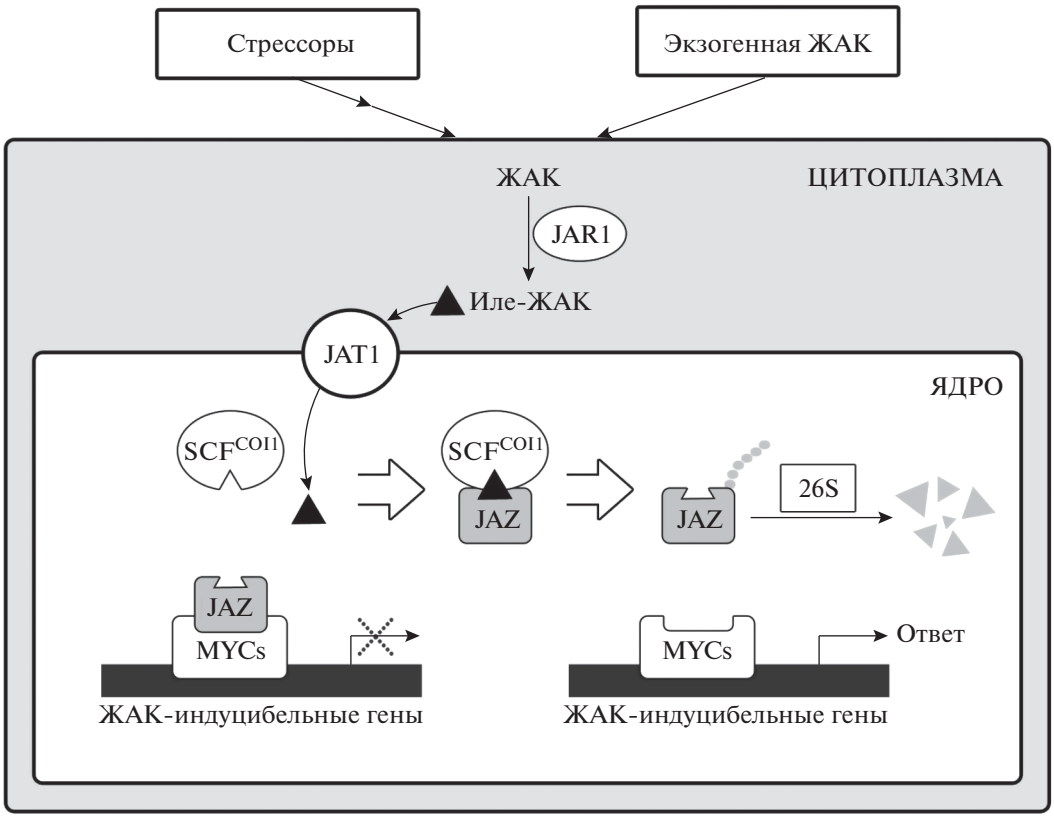

Рис. 1. Основной путь трансдукции жасмонатного сигнала. JAR1 – JAR1-синтаза (jasmonate amino acid synthetase); JAT1 – белок-переносчик Иле-ЖАК (jasmonic acid transfer protein1); SCF/^{COI1}: SCF – Skp1, Cullin, F-box proteins, COI1 – убиквитинлигазный комплекс, участвующий в деградации белков в 26S протеасоме (coronatine insensitive1); JAZ – репрессор жасмонатного сигналинга (jasmonate ZIM-domain protein); MYCs – транскрипционные факторы семейства MYC. Пояснения в тексте.

локализован и в плазматической мембране и при чрезмерном повышении концентрации ЖАК в цитоплазме переносит ее молекулы во внешнее пространство для десенсибилизации сигнала ЖАК.

Установлено, что Иле-ЖАК – единственная форма жасмонатов, способная к связыванию с F-box-белком (COI1) [26]. ЖАК, Ме-ЖАК и 12-оксофитодиеновая кислота такой способностью не обладают. F-box-белок является частью SCF/COI1 – убиквитинлигазного комплекса, участвующего в деградации белков в 26S протеасоме. COI1-белок определяет субстратную специфичность SCF-типа E3 убиквитинлигазы [7]. После взаимодействия Иле-ЖАК с комплексом SCF/COI1 последний приобретает способность к убиквитинированию белков семейства JAZ (Jasmonate-Zim-Domain) – репрессоров жасмонатного сигналинга. JAZ белки содержат два домена, ZIM и Jas, и эти домены опосредуют взаимодействие JAZ с другими белками. Домен ZIM отвечает за его димеризацию и взаимодействие с NINJA, который соединяет супрессор транскрипции TOPLESS с передачей сигналов ЖАК, а домен Jas опосредует JAZ-COI1-взаимодействие [27, 28]. Протеасомная деградация JAZ приводит к высвобождению MYC2 из JAZ-MYC2 комплекса [6].

Ранее считалось, что только белок MYC2 может напрямую взаимодействовать с белками JAZ. Однако в последние годы было показано, что белки MYC3 и MYC4 также взаимодействуют с белками JAZ *in vivo* и *in vitro*, имея сходную ДНК-связывающую специфичность с MYC2 и действуют синергически с MYC2 [29].

Наряду с семейством MYC к жасмонату могут быть чувствительны и транскрипционные факторы семейства MYB. Установлено, что они, как и белки MYC, могут непосредственно репрессироваться белками JAZ, а их высвобождение из JAZ, происходящее под действием сигнала ЖАК, может активировать их целевые гены [8]. К чувствительным к жасмонату относятся и транскрипционные факторы семейства NAC. Относящиеся к этому семейству транскрипционные факторы ATAF1 и ATAF2 у *A. thaliana* индуцируются сигналами ЖАК и участвуют в реакциях, обеспечивающих развитие устойчивости растений к засухе, засолению и агентам окислительного стресса [8, 30].

Также получены экспериментальные доказательства индуцирования транскрипции многих генов *ERF* под влиянием сигналов ЖАК. Эти гены в основном причастны к реакциям растений на действие патогенов, связанным с синтезом монотерпенов, индолов и алкалоидов [31, 32]. Наконец, к жасмонат-регулируемым относятся и некоторые гены большого семейства *WRKY*. В частности, показана жасмонатная регуляция такого важного для адаптации к абиотическим факторам гена, как *WRKY70* [33], а также *WRKY22*, *WRKY50*, *WRKY57* и *WRKY89* [8]. Таким образом, помимо *MYC*, ЖАК может влиять на экспрессию генов еще, как минимум, четырех больших семейств.

ВЛИЯНИЕ ЖАК НА СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

В реализации физиологических эффектов ЖАК наряду с рассмотренными выше специфическими белками участвуют такие универсальные внутриклеточные сигнальные посредники, как Ca^{2+}, АФК, NO и некоторые другие.

Показано, что обработка клеток листьев арабидопсиса 100 мкМ ЖАК вызывала повышение концентрации кальция в цитозоле [34]. При этом индуцируемое ЖАК усиление экспрессии гена *VSP* угнеталось нифедипином и гепарином, что, по мнению авторов, указывает на роль поступления кальция как из апопласта, так и из внутриклеточных компартментов в реализации эффектов ЖАК. Такое же нивелирующее действие на ЖАК-индуцированную экспрессию гена *VSP* оказывал и антагонист кальмодулина W-7, что свидетельствует о его значении для реализации эффектов ЖАК. Еще раньше с использованием ингибиторного метода на растениях арабидопсиса было установлено участие внутриклеточного кальция и кальмодулина в ЖАК-индуцированном синтезе белков ответа на раневой стресс семейства JR [35]. Также показано, что индуцируемое Me-ЖАК накопление PR- (pathogenesis related) белков и фитоалексинов у растений винограда зависело от поступления кальция через кальциевые каналы плазматической мембраны [36]. Повышение теплоустойчивости клеток колеоптилей пшеницы, индуцируемое ЖАК, в значительной степени угнеталось обработкой хелатором внеклеточного кальция ЭГТА, что указывает на роль апопластного кальция в реализации стресс-протекторного действия ЖАК [37]. Вызываемое Me-ЖАК закрывание устьиц также является кальцийзависимым процессом [38] (см ниже). Наконец, установлена зависимость от кальциевого гомеостаза еще одного известного эффекта ЖАК – индуцирования образования латеральных корней. На растениях риса показано, что хелаторы Ca^{2+}, блокаторы кальциевых каналов и антагонисты кальмодулина снижали такой эффект Me-ЖАК [39].

В трансдукции сигнала ЖАК могут быть задействованы и АФК. Так, показано усиление генерации супероксидного анион-радикала и пероксида водорода листьями молодых растений пшеницы, выращенных из семян, обработанных ЖАК [40]. При этом отмечалось повышение активности пероксидазы и оксалатоксидазы и одновременное ингибирование каталазы. Известно, что пероксидазы (особенно апопластные) могут генерировать супероксидный радикал и пероксид водорода [41, 42], оксалатоксидаза в растительных клетках может быть одним из ферментов, образующих пероксид водорода [43].

Под влиянием ЖАК в изолированных колеоптилях пшеницы усиливалась генерация супероксидного анион-радикала [37]. Этот эффект частично подавлялся как ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой, так и ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом.

В процессах активации ЖАК ферментов, генерирующих АФК, могут быть участвовать другие посредники, в частности кальций. Так, вызываемое ЖАК усиление генерации $O_2^{\bullet-}$ на поверхности колеоптилей пшеницы подавлялось хелатором кальция ЭГТА [37].

Еще одним сигнальным посредником, задействованным в реализации физиологических эффектов ЖАК, может быть оксид азота. Показано повышение содержания NO в листьях арабидопсиса после обработки ЖАК [44]. Предобработка растений риса скавенджером NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) угнетала вызываемое ЖАК образование латеральных корней [45]. Обработка растений пшеницы ЖАК, смягчающая негативное влияние засухи на состояние мембран клеток листьев, вызывала повышение содержания NO. При этом скавенджер оксида азота PTIO устранял положительное влияние ЖАК [46]. Обработка проростков пшеницы экзогенной ЖАК также повышала содержание оксида азота в корнях [47]. При этом она индуцировала развитие теплоустойчивости проростков, которое угнеталось PTIO и ингибитором NO-синтазы животных L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester) [47]. Интересно, что индуцированное ЖАК образование оксида азота в корнях проростков пшеницы оказалось зависимым от АФК и подавлялось скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевиной.

В целом, приведенные выше примеры указывают на роль функционального взаимодействия между NO, АФК и ионами кальция при реализации действия ЖАК на растительные объекты. Безусловно, детали этого взаимодействия пока остаются неисследованными. Так, известно лишь

немного примеров конкретных стресс-протекторных систем, контролируемых ЖАК с участием этих посредников [40, 41, 48]. При этом в большинстве работ чаще изучается роль какого-либо одного посредника, а не их функционального взаимодействия друг с другом.

Сообщается и о возможном участии монооксида углерода как посредника эффектов ЖАК. Показано, что обработка ЖАК растений сои, повышающая их устойчивость к действию кадмия и смягчающая окислительные повреждения, вызывала увеличение активности гемоксигеназы [49]. Однако экспрессия гена, кодирующего этот фермент, не изменялась. Авторы полагают, что ЖАК вызывала посттрансляционные модификации гемоксигеназы, механизм которых пока не раскрыт. С другой стороны, показано, что влияние Me-ЖАК на образование латеральных корней у риса сопряжено с повышением не только активности гемоксигеназы, но и с индукцией синтеза мРНК *OsHO1* [39].

Недавно получены данные о вовлечении липидного сигналинга в реализацию стресс-протекторного действия ЖАК. Обработка ЖАК, уменьшающая повреждения мембран листьев арабидопсиса при действии токсических доз меди и кадмия, вызывала усиление экспрессии двух генов, кодирующих разные изоформы фосфолипазы D, при этом у растений дикого типа увеличивалось содержание фосфатидной кислоты. Однако обработка ЖАК слабо влияла на физиологическое состояние мутантов арабидопсиса, дефектных по соответствующим генам фосфолипазы D [50].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЖАК С ФИТОГОРМОНАМИ АКТИВАТОРАМИ РОСТА

Эффекты ЖАК во многом реализуются при функциональном взаимодействии с другими фитогормонами. Имеются сведения о связях ЖАК с индолил-3-уксусной кислотой, цитокининами, гибберелловой кислотой и другими фитогормонами [6].

Следует отметить особое значение взаимодействия ЖАК с цитокининами в реализации его физиологического действия. Известно, именно цитокинины играют центральную роль в гормональной регуляции роста и развития растений [51], поэтому влияние других фитогормонов, в частности ЖАК, на их гомеостаз может быть важно как для ростовых процессов, так и для формирования адаптивных реакций.

Имеются данные как об антагонизме ЖАК и цитокининов, так и о выполнении последними функции посредников в реализации эффектов ЖАК. С одной стороны, сообщается об устранении ЖАК положительного влияния цитокининов на содержание хлорофилла [52]. Также показано, что дифференцировка ксилемы в корнях арабидопсиса регулируется ЖАК, и антагонистическое взаимодействие между ЖАК и цитокинином является важным для ЖАК-зависимого развития ксилемы [53].

С другой стороны, есть исследования, в которых показано , что отдельные эффекты ЖАК могут реализовываться при участии цитокининов. Известно, что в неблагоприятных условиях содержание цитокининов обычно уменьшается [54], в связи с чем важной является способность растений поддерживать уже имеющийся их пул. Ключевым ферментом деградации цитокининов является цитокининоксидаза [55, 56]. Влияние ЖАК на ее активность может быть одной из причин ее стресс-протекторного действия. Так, показано, что инкубация проростков пшеницы на среде с Me-ЖАК приводила к быстрому кратковременному накоплению цитокининов, не влияя при этом на содержание АБК и индолил-3-уксусной кислоты [57]. Такой эффект авторы связывают со значительным снижением экспрессии гена и активности цитокининоксидазы под влиянием Me-ЖАК. На фоне действия солевого стресса обработка Me-ЖАК предотвращала падение содержания цитокининов в проростках. Также под влиянием экзогенного Me-ЖАК отмечалось предотвращение чрезмерного снижения содержания индолил-3-уксусной кислоты в проростках и уменьшение эффекта повышения содержания АБК [57]. Таким образом, Me-ЖАК может смягчать индуцируемые солевым стрессом изменения в гормональной системе растений и тем самым предотвращать чрезмерное ингибирование роста. Естественно, что в целом влияние ЖАК и ее производных на содержание цитокининов (и, по-видимому, других фитогормонов) не может быть однозначным и зависит от видовых особенностей, экспериментальных условий и других факторов [58, 59].

Взаимодействие ЖАК с гибберелловой кислотой (**ГК**) считается преимущественно антагонистическим. Предложена модель, согласно которой в определенных условиях (при низкой концентрации ГК) белки DELLA напрямую взаимодействуют с JAZ и тем самым освобождают белок MYC2, что позволяет реализоваться действию ЖАК. В то же время в присутствии ГК, белки JAZ высвобождаются из комплекса DELLA-JAZ в результате деградации DELLA, при этом свободные JAZ ослабляют действие ЖАК посредством прямого взаимодействия с MYC2 [60]. Эта модель в какой-то мере отображает соотношение между процессами активного роста, связанными со значительной активностью гиббереллинов, и защитными реакциями на действие стрессоров, которые сопряжены с торможением роста [61].

Антагонистическими при регуляции ростовых процессов могут быть и отношения ЖАК с ауксинами. Так, показано, что сигнал ЖАК блокирует экспрессию генов белков PLETHORA (**PLT**), которые ответственны за пролиферацию клеток корня [62]. Однако экспрессия PLT не была подавлена у мутантов по жасмонатному сигналингу *coi1-1* и *myc2*. Показано, что MYC2 может напрямую связываться с промоторами PLT. Таким образом, усиление передачи жасмонатного сигнала может блокировать экспрессию ауксин-чувствительных генов *PLT* [6].

В целом, взаимодействия ЖАК с другими фитогормонами могут быть как антагонистическими, так и синергическими. Многие из таких взаимодействий связаны с участием одних и тех же белков-посредников в трансдукции сигналов разных фитогормонов. Детальное рассмотрение вопросов взаимодействия ЖАК с другими фитогормонами выходит за рамки темы настоящего обзора. Недавно они достаточно подробно были изложены в сводках спецвыпуска International Journal of Molecular Sciences [1, 6].

УЧАСТИЕ КОМПОНЕНТОВ ЖАСМОНАТНОГО СИГНАЛИНГА В РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ

Известно, что увеличение содержания в клетках отдельных сигнальных посредников может формировать сигнал, индуцирующий синтез определенных фитогормонов и зависимые от них физиологические реакции. В частности, с гормональным сигналингом в растительных клетках тесно связаны два ключевых посредника-газотрансмиттера – оксид азота (NO) и сероводород (H_2S). С одной стороны, они участвуют в трансдукции гормональных (в том числе жасмонатных) сигналов в геном растительной клетки [45, 63], с другой – изменение концентрации этих газотрансмиттеров может оказывать влияние на гормональный комплекс [44, 64]. Так, показано, что у растений арабидопсиса в ответ на ранение происходит быстрое усиление генерации оксида азота, которое, в свою очередь, вызывает повышение активности ферментов синтеза ЖАК – липоксигеназ и алленоксидсинтазы [65]. Установлено, что в патогениндуцируемом синтезе ЖАК также участвует NO [66].

Функциональное взаимодействие между ЖАК и оксидом азота происходит не только при формировании ответных реакций растений на стрессоры. Так, вызываемое ЖАК угнетение удлинения корней и усиление их бокового роста у арабидопсиса сочеталось с повышением содержания оксида азота в клетках корней у растений дикого типа [67]. В то же время экзогенный NO слабо влиял на развитие корней жасмонат-нечувствительных мутантов *coi1*. Этот факт может свидетельствовать в пользу роли компонентов жасмонатного сигналинга и(или) самой ЖАК в реализации физиологических эффектов оксида азота [67].

Между сероводородом и ЖАК как участниками сигнальной трансдукции, по-видимому, также существуют прямые и обратные связи. Так, обнаружено усиление генерации сероводорода у растений арабидопсиса при их обработке ЖАК [63]. С другой стороны, молекулярно-генетическими методами получены данные, указывающие на возможность влияния H_2S на экспрессию гена, кодирующего белок COI1 [68].

Еще один ключевой белок жасмонатного сигналинга – транскрипционный фактор JIN1/MYC2 – в настоящее время рассматривается в качестве одного из узловых в передаче многих связанных со стрессом сигналов в растительных клетках [69]. На основании данных, полученных методами биоинформатики, было высказано предположение об участии генов семейства *MYC* в трансдукции сигналов оксида азота [70]. В наших экспериментах показано, что донор оксида азота нитропруссид натрия индуцировал солеустойчивость растений арабидопсиса дикого типа, повышая активность антиоксидантных ферментов и смягчая окислительные повреждения [71]. В то же время положительное влияние донора NO на солеустойчивость мутантов *jin1*, дефектных по гену белка JIN1/MYC2, практически не проявлялось, а у мутантов *coi1* проявлялось очень слабо [72]. Похожей была и реакция арабидопсиса разных генотипов на действие донора сероводорода NaHS. Обработка им растений дикого типа существенно повышала солеустойчивость, увеличивая относительное содержание воды, способствуя сохранению целостности мембран и пула хлорофилла, в то время как влияние донора H_2S на растения генотипа *coi1* было слабым, а у растений *jin1* оно вообще не проявлялось [72]. Полученные результаты указывают на вовлечение компонентов жасмонатного сигналинга в реализацию стресс-протекторного действия газотрансмиттеров H_2S и NO.

По-видимому, ЖАК может быть задействована и в реализации эффектов такого газотрансмиттера, как монооксид углерода (**CO**). Недавно было показано участие жасмонатного сигнального пути в процессе опосредованного CO индуцирования синтеза никотина у растений табака при действии на них высоких температур [73]. Биосинтез никотина в значительной степени лимитируется активностью путресцин-N-метилтрансферазы, обеспечивающей метилирование путресцина, которое является первой стадией пути синтеза никотина. Показано, что действие высокой температуры на растения табака вызывает зависимый от гемоксигеназы биосинтез CO, что, в

свою очередь, индуцирует синтез ЖАК. В результате этого активируется транскрипционный фактор NtMYC2. В обычных условиях NtMYC2 ингибируется белком NtJAZ, но вызываемое монооксидом углерода увеличение содержания ЖАК может способствовать деградации NtJAZ и активации NtMYC2 [74, 75]. С другой стороны, показано, что под влиянием CO усиливается связывание NtMYC2 с промотором гена путресцин-N-метилтрансферазы *NtPMT1* [73]. Таким образом, два механизма – снятие белком NtJAZ блокирования транскрипционного фактора NtMYC2 и усиление его связывания с промотором гена путресцин-N-метилтрансферазы *NtPMT1* – приводят к активации синтеза никотина в ответ на действие гипертермии.

Как уже отмечалось, также сообщается и о влиянии ЖАК на активность гемоксигеназы и синтез CO [49]. Таким образом, по-видимому, CO может не только индуцировать синтез ЖАК, но и выступать в роли посредника при реализации ее эффектов.

В целом, есть основания полагать, что жасмонатный сигналинг и отдельные его компоненты принимают участие в реализации многих физиологических эффектов других сигнальных посредников и абсцизовой кислоты (**АБК**) (рис. 2).

Особенно важным для передачи разнообразных сигналов, по-видимому, является белок жасмонатного сигналинга JIN1/MYC2. Этот транскрипционный фактор контролирует экспрессию генов, активируемых не только ЖАК, но и АБК [69, 76]. Показано, что АБК, как и ЖАК, усиливала экспрессию гена *AtMYC2* [77]. Также обнаружено, что у мутантов арабидопсиса *jin1* слабо проявлялось ростингибирующее действие экзогенной АБК [78]. С другой стороны, растения-трансформанты со сверхэкспрессией гена *AtMYC2* обладали повышенной чувствительностью к АБК и были устойчивы к осмотическому стрессу [79]. В работе [80] показано, что внесение АБК в среду выращивания растений арабидопсиса при солевом стрессе способствовало поддержанию нормальной оводненности у растений дикого типа, но не у мутантов *jin1*. В условиях солевого стресса более высокая активность супероксиддисмутазы (**СОД**), каталазы и гваяколпероксидазы наблюдалась у растений дикого типа, обработанных АБК, но не у мутантов *jin1*. Таким образом, можно предполагать участие ключевого белка жасмонатного сигналинга JIN1/MYC2 в формировании отдельных АБК-индуцированных физиологических реакций растений арабидопсиса. Естественно, что такая интерпретация данных о слабой чувствительности мутантов *jin1* к АБК не является однозначной. Функциональное взаимодействие ЖАК и АБК может включать в себя различные механизмы, часть из них обусловлена тем, что АБК может быть необходима для синтеза ЖАК, а последняя обладает способностью усиливать синтез АБК [81, 82].

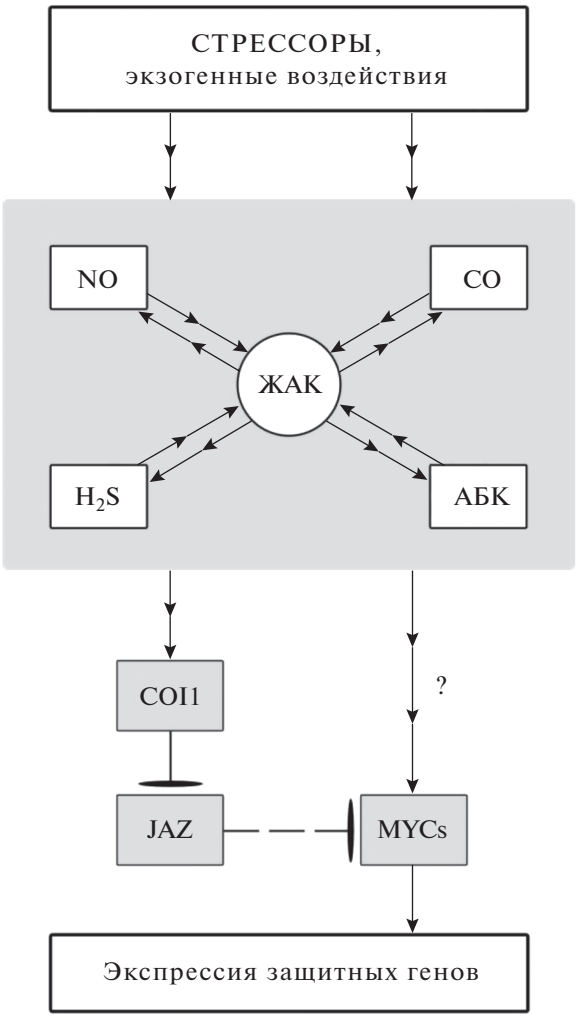

Рис. 2. Вовлечение компонентов жасмонатного сигналинга в реализацию физиологических (стресс-протекторных) эффектов газотрансмиттеров и АБК. Стрессоры либо экзогенное действие ЖАК, АБК или доноров сигнальных молекул приводят к повышению в клетках растений эндогенного содержания соответствующих фитогормонов и/или NO, H_2S, CO. При этом ЖАК обладает способностью индуцировать синтез NO, H_2S, CO и АБК. Синтез ЖАК может быть опосредован АБК или газотрансмиттерами. Сигналы NO, H_2S, CO и АБК могут передаваться в генетический аппарат с участием ключевых белков жасмонатного сигналинга COI1 и MYC. При этом белки семейства MYC могут выполнять роль “хаба” в передаче сигналов, индуцирующих гены, обеспечивающие развитие устойчивости растений к действию стрессоров.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖАК У РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ

Повышение эндогенного содержания ЖАК у растений в ответ на действие стрессоров различ-

ной природы свидетельствует о ее вовлечении в процессы адаптации. Наиболее изученной является индукция синтеза ЖАК у растений при ранении [83]. Обнаружено транзиторное усиление экспрессии генов липоксигеназы, алленоксидсинтазы, алленоксидциклазы и 12-ОФДК-редуктазы при механических повреждениях растений [84, 85]. Как известно, реакции растений на ранение и механическое раздражение имеют много общего с их ответами на действие фитофагов и патогенов, в которых принимает участие ЖАК [7].

В то же время накоплена феноменология повышения содержания ЖАК и в ответ на другие абиотические воздействия: засуху, засоление, стрессовые температуры. Так, например, показано быстрое увеличение эндогенного содержания ЖАК в сегментах листьев ячменя при действии на них агента осмотического стресса маннита [86]. У растений арабидопсиса при засухе отмечалось транзиторное увеличение содержания ЖАК [5, 8]. В листьях сои увеличение содержания ЖАК было быстрым ответом на дегидратацию, по времени опережающим накопление АБК, что может указывать на первичность ЖАК-сигнала по отношению к сигналу АБК при стрессах, связанных с обезвоживанием [3].

При солевом стрессе обнаружено повышение содержания ЖАК у томата, картофеля, риса и других видов [5, 87, 88]. У ячменя в ответ на солевой стресс зафиксирована активация экспрессии генов ключевых ферментов синтеза ЖАК: алленоксидсинтазы, липоксигеназы, 12-ОФДК-редуктазы [89]. Сравнение реакции на солевой стресс томата дикого типа и жасмонатдефицитного мутанта *def-1* показало, что у последнего развивался более глубокий окислительный стресс и отмечались меньшее содержание неферментативных антиоксидантов и низкая активность СОД, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы [90].

У арабидопсиса и риса обнаружено повышение содержания ЖАК в ответ на действие холода, также установлена холодоиндуцируемая экспрессия генов ключевых ферментов синтеза ЖАК – липоксигеназы, алленоксидсинтазы и алленоксидциклазы [91, 92]. Показано усиление синтеза ЖАК у бананов при действии холода [1, 8].

Тепловой стресс также может индуцировать синтез ЖАК. В культуре клеток *Aquilaria sinensis* отмечалось пятикратное транзиторное повышение эндогенного содержания ЖАК с максимумом через 0.5–2.0 ч после прогрева при 50°C [93]. При этом зарегистрировано усиление экспрессии генов ферментов синтеза ЖАК: липоксигеназы, алленоксидсинтазы и алленоксидциклазы, а также гена, кодирующего основной белок трансдукции сигнала ЖАК, MYC2. С другой стороны, у проростков риса при тепловом стрессе содержание ЖАК снижалось [94]. У растений арабидопсиса при продолжительном умеренном тепловом стрессе содержание ЖАК повышалось незначительно, однако при его сочетании с интенсивным освещением оно увеличивалось в несколько раз [94]. Вероятно, изучаемые эффекты зависят от видовых особенностей объектов, а также силы и продолжительности стрессового воздействия.

Кроме того, хорошо известно, что увеличение эндогенного содержания ЖАК в органах растений может быть индуцировано не только действием стрессоров, но и многими сигнальными посредниками, а также экзогенной ЖАК, которая вызывает усиление экспрессии генов ключевых ферментов липоксигеназного каскада алленоксидсинтазы, алленоксидциклазы и липоксигеназы [95] и увеличение количества этих белков в клетках [96].

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ЖАК И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ СТРЕСС-ФАКТОРОВ

За последние два десятилетия накоплена обширная феноменология повышения устойчивости растений разных таксономических групп к действию стресс-факторов различной природы при экзогенном воздействии ЖАК.

Обработка растений арабидопсиса Me-ЖАК значительно повышала морозоустойчивость как в сочетании с холодовой акклиматизацией (закаливание в течение недели при 4°C), так и без нее [97]. В то же время дефектные по жасмонатному сигналингу (*jar1* и *coi1*) или по синтезу ЖАК (*lox2* и *aos*) растения отличались пониженной морозоустойчивостью. Также установлен конкретный механизм участия жасмонатного сигналинга в регуляции экспрессии генов, важных для морозоустойчивости. Показано, что белки-репрессоры передачи сигналов ЖАК JAZ угнетают транскрипционную функцию ICE и сигнальный путь ICE-CBF/DREB1, под контролем которого находится целый ряд белков COR (cold regulated protein), необходимых для адаптации к низким температурам [92, 97, 98]. При этом экзогенная ЖАК либо синтезируемая в результате холодового закаливания, индуцируя деградацию белков JAZ, снимает блок с сигнального пути ICE-CBF/DREB1, контролирующего экспрессию генов *COR*.

Предобработка растений огурца Me-ЖАК уменьшала повреждающий эффект низкой положительной температуры, что проявлялось в меньшем торможении ростовых процессов и снижении интенсивности окислительного стресса [99].

В прикладных исследованиях, связанных с поиском способов уменьшения повреждений плодов при низкотемпературном хранении, показано повышение экзогенным Me-ЖАК устойчивости

к низким температурам плодов различных видов растений: цуккини [100], манго [101], гуавы [102], сладкого перца, томатов [103], граната [104], персика [105], мушмулы [106] и других. Также известно, что синтетический аналог жасмонатов прогидрожасмон (*n*-пропилдигидрожасмонат) используется для обработки древесных растений с целью повышения морозоустойчивости [107].

Данных о влиянии экзогенной ЖАК на теплоустойчивость растений значительно меньше. Показано повышение выживания изолированных колеоптилей пшеницы после прогрева при 46°С при их предварительной обработке 1 мкМ ЖАК [37]. Как отмечалось выше, у некоторых объектов зарегистрировано повышение содержания эндогенной ЖАК в ответ на тепловой стресс [93].

Более изучено влияние ЖАК на устойчивость растений к стрессу дегидратации. Me-ЖАК смягчал действие осмотического стресса на листья клубники, что выражалось в уменьшении накопления продуктов пероксидного окисления липидов (**ПОЛ**) [108]. Обработка ЖАК молодых растений разных видов *Brassica* также уменьшала образование продукта ПОЛ малонового диальдегида (**МДА**), способствовала сохранению близкого к нормальному содержания воды в листьях и накоплению биомассы при обезвоживании, вызываемом обработкой ПЭГ-6000 [109]. Аналогичные результаты получены и с использованием молодых растений пшеницы, их обработка ЖАК уменьшала накопление продуктов ПОЛ и способствовала сохранению целостности мембран при действии осмотического стресса [46]. Обработка *Prunus armeniaca* ЖАК также уменьшала вызываемое засухой накопление МДА в листьях [110]. При действии Me-ЖАК на этиолированные проростки пшеницы повышались их сырая и сухая биомасса, а также содержание воды при выращивании на среде с 12% ПЭГ-6000 [111]. Предпосевная обработка семян кукурузы ЖАК способствовала нормальному поглощению элементов минерального питания в условиях почвенной засухи [112].

Экзогенные ЖАК [113, 114] и Me-ЖАК [115] повышали солеустойчивость растений арабидопсиса дикого типа, что проявлялось в смягчении ростингибирующего действия засоления, уменьшении окислительных повреждений и сохранении пула фотосинтетических пигментов в стрессовых условиях. В то же время у мутантов арабидопсиса, дефектных по жасмонатному сигналингу (*jin1*, *coi1*) базовая устойчивость к солевому стрессу была ниже, чем у растений дикого типа, также их солеустойчивость практически не изменялась под влиянием экзогенных ЖАК или Me-ЖАК [114, 115]. Опрыскивание растений пшеницы ЖАК перед действием солевого стресса снижало накопление МДА и способствовало сохранению пула фотосинтетических пигментов [116]. Обработка растений кукурузы ЖАК также повышла их солеустойчивость, уменьшая поступление ионов Na^+ в клетки корней [117]. Экзогенный Me-ЖАК повышал устойчивость *Robinia pseudoacacia* к засолению, что проявлялось в сохранении близкого к нормальному относительного содержания воды и меньшем накоплении продукта ПОЛ МДА в стрессовых условиях [118]. Опрыскивание ЖАК оливковых деревьев, выращиваемых на засоленной почве, повышало содержание хлорофилла, площадь листьев и сбор урожая [119].

Во многих работах исследовано влияние ЖАК на устойчивость растений к действию тяжелых металлов. Экзогенная ЖАК смягчала отрицательное влияние токсических доз меди на растения *Cajanus cajan*, что выражалось в уменьшении ингибирования роста корней и накопления МДА в побегах [120]. Обработка Me-ЖАК снижала эффект ингибирования ионами Cd^{2+} роста корней у растений *Solanum nigrum*, также в присутствии экзогенного Me-ЖАК уменьшалось вызываемое действием тяжелого металла накопление МДА в листьях [121]. Позитивное влияние, выражающееся в смягчении эффекта окислительного стресса и сохранении пула хлорофилла, Me-ЖАК оказывал и на подвергнутые токсическому действию ионов Cd^{2+} растения *Capsicum frutescens* [122]. Подобные эффекты ЖАК отмечались при кадмиевом стрессе на растениях рапса [123]. Экзогенная ЖАК оказывала защитное влияние и на растения арабидопсиса, подвергнутые токсическому действию сульфатов меди и кадмия, что проявлялось в смягчении их ростингибирующего эффекта и уменьшении накопления МДА в листьях [45]. Обработка ЖАК растений сои уменьшала проявление эффекта ПОЛ при действии на них никеля [124].

АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ЖАК

Изложенные выше сведения о повышении эндогенного содержания ЖАК и развитии устойчивости растений к различным абиотическим стресс-факторам под влиянием экзогенной ЖАК и ее производных свидетельствуют о способности этих соединений индуцировать разнообразные стресс-протекторные системы растений. Такие эффекты могут быть связаны с тем, что множественные сигнальные пути в растениях сложно переплетены, при этом модуляция содержания одних сигнальных посредников и фитогормонов вызывает изменения других звеньев сигнально-регуляторной сети. Кроме того, активность одних и тех же транскрипционных факторов может изменяться под влиянием сигналов, индуцируемых различными агентами. Наконец, несмотря на специфичность адаптации растений к определенным стресс-факторам, важное значение для устойчивости имеют и общие протекторные системы [125]. К ним отно-

сятся антиоксидантная система, комплекс стрессовых белков, некоторые полифункциональные низкомолекулярные протекторные соединения. Одной из универсальных реакций растений на многие как биотические, так и абиотические стрессовые воздействия, проявляющихся на уровне целого организма, является закрывание устьиц [126]. В регуляции всех перечисленных универсальных защитных реакций в той или иной степени задействована ЖАК и ее производные.

Антиоксидантная система. Нарушения процессов, связанных с редокс-регуляцией, и окислительные повреждения являются наиболее частыми последствиями действия на растения стресс-факторов. В связи с этим среди стресс-протекторных систем наиболее универсальной считается антиоксидантная [127]. Жасмонатный сигналинг является чрезвычайно важным для защиты растений при их инфицировании патогенами-некротрофами. При этом одна из составляющих защитных реакций, индуцируемых жасмонатами, – активация антиоксидантной системы [40]. В то же время она важна и для защитного ответа на действие практически любого абиотического стрессора.

Эффекты усиления функционирования антиоксидантной системы под влиянием ЖАК зарегистрированы у растений разных видов при действии стрессоров различной природы (табл. 1). В ряде работ зафиксирована связь между увеличением под влиянием стрессовых воздействий содержания эндогенной ЖАК и активацией антиоксидантной системы [94, 131]. Однако в большинстве работ влияние ЖАК на состояние антиоксидантной системы исследовалось путем экзогенных обработок растительных объектов фитогормоном (табл. 1). При этом следует обратить внимание на очень широкий диапазон концентраций ЖАК или Ме-ЖАК, индуцирующих антиоксидантную систему – от пикомолярных [124] до миллимолярных [109, 142]. Можно полагать, что для ЖАК даже в высоких концентрациях не характерны выраженные токсические эффекты, вызывающие необратимые нарушения про-/антиоксидантного равновесия в растительных клетках. При этом, однако, как уже отмечалось, ЖАК способна усиливать образование АФК и именно это может быть причиной активации под ее влиянием антиоксидантной системы. Так, активации под влиянием ЖАК антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы и гваяколпероксидазы) в колеоптилях пшеницы предшествовало во времени усиление генерации АФК, зависимое как от НАДФН-оксидазы, так и от внеклеточной пероксидазы [37]. Более того, предполагается, что в определенных условиях индуцирование ЖАК антиоксидантной системы включает в себя происходящее ранее усиление ПОЛ [128, 130]. Роль других посредников в активации ЖАК антиоксидантной системы изучена пока слабо. Результаты ингибиторного анализа указывают на возможную опосредованность таких эффектов ЖАК газотрансмиттерами – NO [46] и CO [49].

При исследовании влияния ЖАК или Ме-ЖАК анализируется в основном активность антиоксидантных ферментов, хотя в последние годы накопились данные и об усилении экспрессии генов, кодирующих соответствующие ферменты: СОД, каталазу, аскобатпероксидазу, неспецифическую пероксидазу и ряд других (табл. 1). Причем в некоторых случаях такие эффекты ЖАК и ее производных зафиксированы не только на фоне действия стрессоров, но и в обычных условиях [37, 46, 49, 116, 129, 136], что может указывать на специфическую роль фитогормона в активации антиоксидантной системы. Причинно-следственную связь между синтезом ЖАК и активацией экспрессии генов антиоксидантных ферментов удалось доказать и молекулярно-генетическими методами: при действии на растения арабидопсиса дикого типа высоких температур и избыточного освещения отмечалось повышение содержания ЖАК и одновременное усиление экспрессии двух генов, кодирующих формы цитозольной аскорбатпероксидазы – *APX1* и *APX2* [94]. При этом у мутантов по синтезу ЖАК (растений *aos*, дефектных по гену алленоксидсинтазы) такого эффекта не наблюдалось.

Получены сведения и об индуцировании ЖАК накопления низкомолекулярных антиоксидантов у растений, как в обычных, так и в стрессовых условиях. Так, установлено, что транскрипционный фактор JIN1/MYC2 участвует в регуляции экспрессии генов ферментов, обеспечивающих синтез аскорбата и цистеина [143]. Кроме того, белок JIN1/MYC2, действуя как положительный регулятор экспрессии генов MYB75/PAP1 и EGL3, принимает участие в синтезе флавоноидов [144], которые отличаются высокой антиоксидантной активностью и могут вносить существенный вклад в устойчивость растений к действию стрессоров [127, 145, 146]. При солевом стрессе обработка ЖАК растений арабидопсиса дикого типа способствовала поддержанию высокого содержания антоцианов и бесцветных флавоноидов (поглощающих в области УФ-В) [114]. В то же время у мутантов *jin1* содержание флавоноидных соединений при обработке ЖАК почти не изменялось, а в стрессовых условиях значительно уменьшалось. При низкотемпературном хранении обработка Ме-ЖАК плодов гуавы повышала активность ключевого фермента синтеза вторичных метаболитов фенилаланинаммонийлиазы и увеличивала общее содержание фенольных соединений [102].

ЖАК, по-видимому, важна для многих звеньев вторичного метаболизма. Так, показана ее роль в

Таблица 1. Влияние ЖАК и ее производных на состояние антиоксидантной системы растений

Объект	Действие жасмоната	Характер влияния на компоненты антиоксидантной системы	Источник
Triticum aestivum, колеоптили	Экзогенная ЖАК, 10 мкМ	Повышение активности СОД, каталазы, аскорбатпероксидазы и гваяколпероксидазы в обычных условиях и после действия теплового стресса	[37]
Triticum aestivum, листья	Экзогенная ЖАК, 1 или 2.5 мМ	Повышение активности СОД в обычных условиях и при действии УФ-В	[128]
	Экзогенный Ме-ЖАК, 0.25 мкМ	Повышение активности СОД, каталазы аскорбатпероксидазы и пероксизады в обычных условиях и на фоне засухи	[129]
	Экзогенная ЖАК, 2 мМ	Повышение количества транскриптов и активности СОД, каталазы и гваяколпероксидазы в обычных условиях и на фоне солевого стресса	[116]
	Экзогенная ЖАК, 2 мкМ	Повышение активности аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы, дегидроаскорбатредуктазы и монодегидроаскорбат-редуктазы, содержания аскорбата и GSH в обычных условиях и при осмотическом стрессе	[46]
Arachis hypogaea, листья и корни	Экзогенный Ме-ЖАК, 25–250 мкМ	Повышение активности СОД, каталазы и пероксидазы, появление двух новых молекулярных форм пероксидазы	[130]
Arabidopsis thaliana, листья	Увеличение содержания эндогенной ЖАК при сочетанном действии гипертермии и избыточного освещения	Усиление экспрессии генов аскобатпероксидазы *APX1*, *APX2* у растений Col-0 и отсутствие эффекта у мутантов *aos*	[94]
	Экзогенные ЖАК (0.1 мкМ) или Ме-ЖАК (50 мкМ)	Повышение активности СОД и гваяколпероксидазы при солевом стрессе у растений Col-0 и отсутствие эффектов у мутантов *jin1* и *coi1*	[113, 115]
Agropyron cristatum, листья	Увеличение содержания эндогенной ЖАК в ответ на обезвоживание	Зависимое от ЖАК усиление экспрессии генов аскорбатпероксидазы, дегидроаскорбатредуктазы и монодегидроаскорбатредуктазы, повышение содержания аскорбата и GSH при осмотическом стрессе	[131]
Solanum tuberosum, листья	ЖАК (0.1 мкМ)	Повышение активности пероксидазы, снижение активности каталазы	[132]
Glycine max, листья	ЖАК (1 пМ)	Повышение активности СОД, каталазы, гваяколпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, аскорбатпероксидазы, дегидроаскорбатредуктазы, глутатиоредактазы, содержания аскорбата и GSH в обычных условиях и при действии никеля	[124]
Glycine max, корни	ЖАК (20 мкМ)	Повышение активности СОД и каталазы, содержания аскорбата в обычных условиях и при действии кадмия	[49]

Таблица 1. Окончание

Объект	Действие жасмоната	Характер влияния на компоненты антиоксидантной системы	Источник
Glycine max, листья	ЖАК (1 нМ)	Повышение экспрессии генов и активности СОД, каталазы, неспецифической пероксидазы, аскорбатпероксидазы и содержания аскорбата при действии никеля	[133]
Vicia faba, листья	ЖАК (1 мкМ)	Повышение активности СОД, каталазы, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы при действии кадмия	[134]
Zea mays, листья	ЖАК (10 нМ – 1 мкМ)	Повышение активности СОД, каталазы, гваяколпероксидазы, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы в обычных условиях и при действии никеля	[135]
Zea mays, каллусы	Me-ЖАК (3.3 или 10 мкМ)	Усиление синтеза антоцианов	[136]
Capsicum frutescens, листья	Me-ЖАК (0.1 мкМ)	Повышение активности СОД, каталазы, аскорбатпероксидазы при действии кадмия	[137]
Brassica (различные виды), листья	ЖАК (0.5–1 мМ)	Повышение активности аскорбатпероксидазы, монодегидроаскорбатредуктазы, дегидроаскорбатредуктазы, глутатионредуктазы, содержания аскорбата и GSH при засухе	[109]
Brassica napus листья	Me-ЖАК (1 мкМ)	Усиление экспрессии генов и повышение активности СОД, аскорбатпероксидазы, каталазы, глутатионредуктазы, содержания аскорбата и GSH при действии мышьяка	[138]
	ЖАК (1 нМ)	Повышение содержания антоцианов, каротиноидов,α-токоферола и аскорбиновой кислоты в обычных условиях и при действии солевого стресса	[139]
Brassica juncea, листья	ЖАК (0.1 мкМ)	Повышение активности СОД, каталазы, пероксидазы, глутатион-S-трансферазы, содержания аскорбата, GSH, токоферола, и фенольных соединений при действии токсиканта имидоклаприда	[140]
Lemna valdiviana, листья	ЖАК (50–500 мкМ)	Повышение активности СОД, каталазы, неспецифической пероксидазы, глутатионпероксидзы и глутатионредуктазы при действии мышьяка	[141]
Hibiscus sabdariffa, листья	ЖАК (1 мМ)	Повышение активности аскорбатпероксидазы, содержания антоцианов и флавоноидов при солевом стрессе	[142]

индуцируемом гипертермией синтезе сесквитерпенов у растений *Aquilaria sinensis*. Тепловой шок у этих растений приводил к резкому усилению экспрессии генов липоксигеназы, алленоксидсинтазы, белка MYC2 и увеличению содержания ЖАК, после чего отмечалось накопление сесквитерпенов [93]. При этом ингибитор синтеза ЖАК NDGA (nordihydroguaiaretic acid) подавлял индуцированный высокой температурой синтез сесквитерпенов.

Мультифункциональные низкомолекулярные соединения. Одним из наиболее многофункциональных стрессовых продуктов первичного метаболизма растений является пролин. В настоящее

время считается, что помимо известной функции совместимого осмолита, он выполняет антиоксидантные функции [147]. Также пролин рассматривается как низкомолекулярный шаперон, который может участвовать в поддержании нативной структуры ферментов [148]. В листьях сои [149] и плодах банана [150] содержание пролина возрастало под действием экзогенного Ме-ЖАК. При этом была установлена положительная связь между уровнем экспрессии гена *MYC2* и накоплением пролина. Усиление накопления пролина при почвенной засухе под влиянием Ме-ЖАК зарегистрировано у растений кукурузы [112]. У пшеницы ЖАК усиливала накопление пролина в листьях при стрессовом воздействии УФ-В [128].

У бобов обнаружено повышение содержания пролина при обработке ЖАК в условиях стресса, вызываемого токсическим действием кадмия [134]. В листьях *Hibiscus sabdariffa* показано усиление синтеза пролина под влиянием экзогенной ЖАК в условиях солевого стресса [142].

Обработка Ме-ЖАК в отсутствие действия стрессоров не оказывала существенного влияния на содержание пролина в листьях арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов по жасмонатному сигналингу *jin1* и *coi1*. После солевого стресса оно увеличивалось у растений всех трех генотипов, однако предварительное воздействие Ме-ЖАК вызывало дополнительное повышение количества пролина только у растений дикого типа [115]. Следует также отметить, что на растениях кукурузы показана роль ЖАК как позитивного регулятора синтеза АБК, которая также индуцирует синтез пролина [151]. В связи с этим не исключено, что индуцирование ЖАК накопления пролина, по крайней мере, отчасти, может быть опосредовано АБК.

С другой стороны, имеются сведения и о снижении содержания пролина у растений под влиянием ЖАК. Так, у растений рода *Brassica* обработка ЖАК уменьшала индуцируемый засухой эффект повышения содержания пролина [109]. Не исключено, что отдельные эффекты ЖАК могут иметь видовую специфичность. Также вероятно, что в определенных условиях ЖАК индуцирует не накопление пролина, а другие протекторные системы.

В целом же, есть основания полагать, что жасмонатный сигнальный путь принимает участие в регуляции содержания пролина при стрессах, связанных с дегидратацией. Наряду с пролином под влиянием ЖАК и ее производных у растений могут накапливаться ароматические аминокислоты и аминокислоты с разветвленной цепью, которые также относят к защитным метаболитам [152].

Помимо аминокислот важными полифункциональными протекторами растительных клеток считаются сахара. Их накопление зарегистрировано в ответ на действие стрессоров различной природы на растения [153–155]. Одной из важных функций растворимых углеводов, накапливаемых при стрессах, является их антиденатурационное действие на белково-липидные компоненты клеток, которые испытывают дегидратацию или влияние других альтерирующих факторов. Показано, в частности, что сахароза может заменять воду в структуре фосфолипидов при стрессовых воздействиях, которые вызывают обезвоживание клеток [156]. Достаточно давно известно, что сахарам присущи и антиоксидантные свойства, обусловленные способностью связывать свободные радикалы [157]. Так, в растениях арабидопсиса, обработанных глюкозой, накапливалось меньше синглетного кислорода и пероксида водорода [158].

К регуляции содержания сахаров при стрессах ЖАК может иметь если не прямое, то, по крайней мере, косвенное отношение. Например, показано, что под влиянием солевого стресса происходило незначительное уменьшение содержания сахаров в листьях растений арабидопсиса дикого типа и более заметное его снижение у дефектных по жасмонатному сигналингу мутантов *jin1*. В то же время у растений дикого типа, обработанных ЖАК, после солевого стресса содержание сахаров не только не уменьшалось, но и существенно возрастало [114]. Обработка ЖАК растений *jin1* подобного эффекта не вызывала. Повышение содержания сахаров при солевом стрессе под влиянием ЖАК зафиксировано и у растений гибискуса [142]. Методами протеомики было показано, что среди белков, количество которых при действии ЖАК заметно изменялось – ферменты углеводного обмена [159]. Сведения о положительном влиянии ЖАК на накопление углеводов [1, 5] согласуются с данными о ее способности поддерживать фотосинтетическую активность растений в стрессовых условиях [88]. С другой стороны, в ряде исследований под влиянием ЖАК в стрессовых условиях зафиксировано уменьшение содержания метаболитов, связанных с активным ростом, в том числе сахаров, но увеличение количества фосфорилированных гексоз, ответственных за подавление роста и фотосинтеза [152]. Возможно, влияние ЖАК и ее производных на накопление растворимых углеводов может быть различным в зависимости от силы стрессового воздействия.

Защитные белки и пептиды. Показано участие ЖАК в индуцировании синтеза дегидринов – LEA (late embryogenesis abundant) белков группы 2, важных для адаптации растений к обезвоживанию. Установлена способность Ме-ЖАК индуцировать транскрипционную активность *TADHN* гена дегидрина и накопление белков дегидринов с мол. массой 28 и 55 кДа в проростках пшеницы в обычных условиях и дополнительно увеличи-

вать их содержание при осмотическом стрессе, вызываемом маннитом [160].

Как уже отмечалось, под контролем жасмонатного сигналинга у растений разных видов также находится экспрессия генов *COR*, кодирующих особую группу белков, важных для адаптации к низким температурам [97, 161].

Сообщается и об усилении под влиянием ЖАК синтеза растениями белков-тионеинов, связывающих тяжелые металлы. Показано усиление экспрессии гена металлотионеина типа-2 (КоМТ2) в листьях проростков *Kandelia obovata*, подвергнутых стрессовому воздействию Cd^{2+}, при обработке Ме-ЖАК [162].

ЖАК и регуляция состояния устьичного аппарата растений. Закрывание устьиц, вызываемое жасмонатами, считается одной из важных защитных реакций, направленных на предотвращение проникновения патогенов через листья [163]. Однако в настоящее время этот эффект ЖАК и ее производных рассматривают и как механизм, повышающий устойчивость растений к абиотическим стресс-факторам, в первую очередь к засухе [48]. Он также может быть важен для солеустойчивости и резистентности к действию тяжелых металлов, поскольку уменьшение транспирации снижает поступление в растение токсичных ионов [159].

На состояние устьиц влияют как ЖАК, так и другие продукты липоксигеназного каскада [48, 163]. Показано, что ЖАК может регулировать состояние устьиц зависимым и независимым от АБК способами [164]. В первом случае АБК выступает в роли посредника эффекта ЖАК. Установлено, что ЖАК, как и АБК, может активировать медленные анионные каналы S-типа, обеспечивающие выход ионов из замыкающих клеток и уменьшение их тургора [48].

В целом, экспериментальные данные об устьичных реакциях, индуцируемых ЖАК и Ме-ЖАК, довольно многочисленны, хотя и противоречивы. Например, показано, что эти соединения вызывали закрывание устьиц только в концентрациях выше 20 мкМ [27]. При обработке эпидермиса ЖАК и Ме-ЖАК в меньших концентрациях такой эффект не проявлялся; более того, обнаружено ингибирование этими соединениями закрывания устьиц, вызываемого АБК. В некоторых работах зарегистрировано увеличение устьичной апертуры под влиянием Ме-ЖАК [48]. С другой стороны, установлено, что 12-ОФДК (предшественник ЖАК) более эффективно индуцировала закрывание устьиц у арабидопсиса по сравнению с Ме-ЖАК [2].

Как отмечалось, в рецепции и трансдукции сигналов ЖАК ключевую роль играют гены *JAR1*, *COI1* и *MYC2*. В то же время их значение в регуляции устьичного аппарата изучено недостаточно. Показано, что у мутантной линии арабидопсиса *jar1-1* устьица были нечувствительны к обработке Ме-ЖАК, но закрывались под влиянием АБК, хотя и в меньшей степени, чем у растений дикого типа Col-0 [165]. У мутантов *coi1* существенных изменений состояния устьиц при обработке Ме-ЖАК не происходило [27].

В наших исследованиях, выполненных на листьях растений арабидопсиса разных генотипов, показано, что под действием Ме-ЖАК в концентрациях 50–200 мкМ величина устьичной апертуры у растений дикого типа (Col-0) существенно уменьшалась. У мутантов *jin1* и *jar1* при обработке Ме-ЖАК в различных концентрациях показатели, характеризующие устьичную активность, почти не изменялись, хотя у генотипа *coi1* отмечалась тенденция к некоторому уменьшению величины устьичной щели [166].

Влияние ЖАК на состояние устьичного аппарата реализуется с участием основных клеточных сигнальных посредников [48]. Так, достаточно давно установлено участие различных пулов кальция в проявлении эффекта закрывания устьиц у растений арабидопсиса при действии метилжасмоната [38]. Блокаторы кальциевых каналов рутениевый красный и хлорид лантана полностью снимали вызываемое обработкой фитогормоном закрывание устьиц. Этот эффект метилжасмоната полностью устранялся и при обработке эпидермиса антагонистом кальмодулина трифторперазином. В то же время обработка хелатором внеклеточного кальция ЭГТА лишь частично снимала эффект закрывания устьиц, вызываемый Ме-ЖАК.

Наряду с кальцием, посредниками в реализации эффектов жасмоната могут быть АФК и оксид азота. Обнаружено повышение содержания NO и пероксида водорода в замыкающих клетках у растений *Arabidopsis thaliana* и *Vicia faba* при обработке ЖАК или Ме-ЖАК [167, 168]. Считается, что усиление образования АФК при индуцировании устьичных реакций жасмонатом происходит в основном за счет повышения активности НАДФН-оксидазы [48].

В работе Лиу с соавт. [167] на эпидермисе листьев бобов, показано, что закрывание устьиц, вызываемое ЖАК, устранялось ингибитором NO-синтазы животных L-NAME. В наших исследованиях установлено, что индуцированное Ме-ЖАК уменьшение размера устьичной щели и количества открытых устьиц у растений арабидопсиса практически полностью устранялось предварительной обработкой клеток эпидермиса скавенджером оксида азота PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) и частично ингибиторами NO-синтазы животных (L-NAME) и нитратредуктазы (вольфраматом натрия) [169]. Таким образом, полученные результаты показывают значение образования NO двумя основными путями (окислительным и восстановительным) в

реализации эффектов Me-ЖАК на состояние устьиц. Однако на эпидермисе *Vicia faba* было показано, что ингибирование нитратредуктазы не снимает эффект закрывания устьиц, вызываемый ЖАК [167]. Возможно, что вклад различных путей синтеза NO в замыкающих клетках может изменяться в зависимости от вида и возраста растений, а также экспериментальных условий.

В целом, влияние Me-ЖАК на состояние устьиц опосредовано АФК и NO, образующимися с участием НАДФН-оксидазы, нитратредуктазы и, возможно, каталитического комплекса, по действию подобного NO-синтазе животных (рис. 3). Считается, что АФК оказывают влияние в первую очередь на кальциевые каналы плазматической мембраны, в то время как NO – на внутриклеточные кальциевые каналы [48]. Повышение концентрации кальция в цитозоле, происходящее за счет его поступления извне, а также из внутриклеточных компартментов приводит к активации анионных каналов S-типа, в результате чего происходит выход ионов из замыкающих клеток, приводящий к потере ими тургора и закрыванию устьиц (рис. 3).

Закрывание устьиц у растений может быть индуцировано не только засухой, но и засолением. Эффект осмотического стресса у растений в ответ на повышение концентрации солей в среде проявляется быстро и вызывает резкое снижение устьичной проводимости [170, 171]. Для выяснения возможной роли жасмонатного сигналинга в регуляции состояния устьиц при солевом стрессе исследовали влияние обработки хлоридом натрия листьев растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантов, дефектных по жасмонатному сигналингу. 2–3-часовое воздействие NaCl индуцировало закрывание устьиц у растений дикого типа (Col-0). В то же время обработка NaCl листьев мутанта *jin1* практически не влияла на состояние устьиц. У растений генотипа *coi1* под влиянием соли происходило сравнительно небольшое уменьшение устьичной апертуры [172]. Возможно, что мутация по гену *jin1*, кодирующему транскрипционный фактор JIN1/MYC2, более существенно сказывается на процессах устьичной регуляции, поскольку, как уже отмечалось, этот белок участвует в трансдукции сигналов не только жасмоната, но и АБК [69, 173].

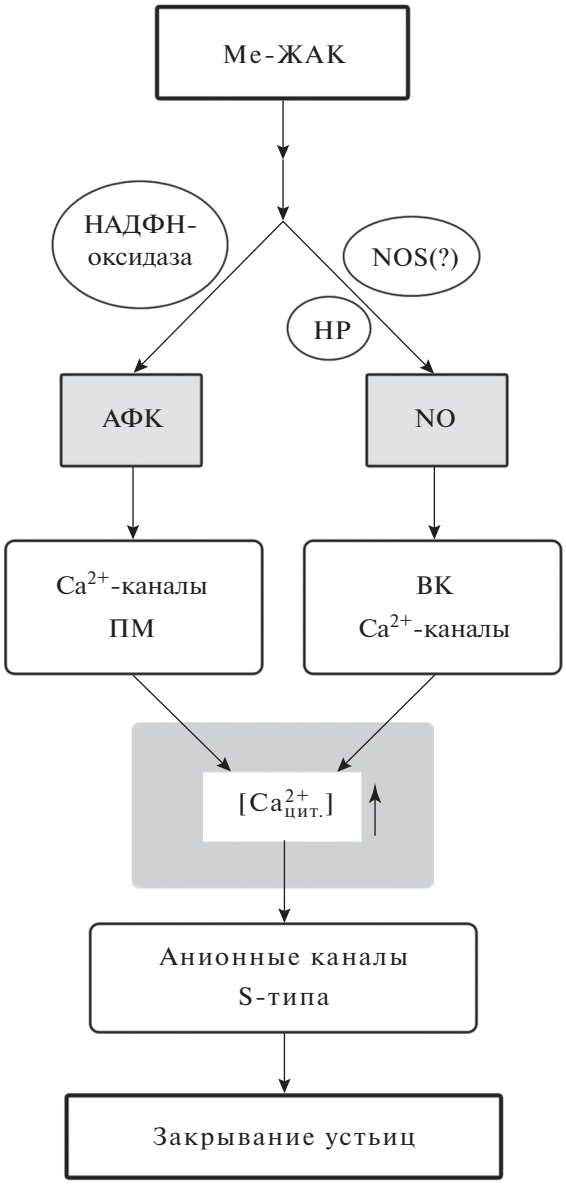

Рис. 3. Гипотетический механизм индуцирования закрывания устьиц Me-ЖАК. NOS – фермент с каталитической активностью, подобной NO-синтазе животных; НР – нитратредуктаза; Ca^{2+}-каналы ПМ – кальциевые каналы плазматической мембраны; ВК Ca^{2+}-каналы – внутриклеточные кальциевые каналы. Пояснения в тексте.

* * *

Изложенные факты позволяют заключить, что ЖАК и жасмонатному сигналингу принадлежит ключевая роль в адаптации растений к действию стрессоров различной природы, в том числе ко многим неблагоприятным абиотическим факторам. В последние годы была получена новая важная информация о синтезе и транспорте ЖАК и ее предшественников. Как известно, первые стадии синтеза ЖАК происходят в хлоропластах, их продуктом является 12-ОФДК. В настоящее время установлено, что 12-ОФДК транспортируется с помощью АТФ-связывающего белка-транспортера CTS в пероксисомы, где происходят заключительные стадии синтеза ЖАК [15]. Синтезированная в пероксисомах ЖАК высвобождается в цитоплазму. Основные ее физиологические эффекты связаны с превращением в Иле-ЖАК с помощью с помощью белка JAR1. Недавно установ-

лено, что Иле-ЖАК через ядерную мембрану переносит белок AtJAT1 [15, 25]. Попадающий в ядро Иле-ЖАК взаимодействует с комплексом SCF/COI1, в результате чего происходит убиквитинирование репрессоров жасмонатного сигналинга JAZ и высвобождение ряда транскрипционных факторов (в первую очередь, MYCs), регулирующих экспрессию жасмонатиндуцибельных генов.

Широкий спектр адаптивных реакций, на которые влияют ЖАК и ее производные, может быть обусловлен ее способностью вызывать изменение содержания многих сигнальных посредников, в частности, кальция, АФК, газотрансмиттеров – NO, H_2S и CO. С другой стороны, есть основания полагать, что отдельные компоненты жасмонатного сигналинга вовлекаются в трансдукцию сигналов других посредников (рис. 2). Особенно ярким примером в этом отношении может быть транскрипционный фактор JIN1/MYC2 и, возможно, другие транскрипционные факторы семейства MYC, которые участвуют в трансдукции сигналов не только ЖАК, но и АБК [80], а также в реализации физиологических (стресс-протекторных) эффектов таких посредников-газотрансмиттеров как NO и H_2S [72].

Эффекты ЖАК также реализуются за счет функционального взаимодействия с другими фитогормонами. Особое значение в этом отношении имеет установленный сравнительно недавно эффект усиления накопления цитокининов, вызываемый ЖАК [57]. По всей вероятности, это смягчает вызываемое стрессорами ингибирование роста и таким образом ЖАК может способствовать балансу ростовых и адаптивных процессов. С другой стороны, ЖАК находится в антагонистических отношениях с ауксином и гибберелловой кислотой [6], что позволяет рассматривать ее все же как “гормон стресса”, а не “гормон роста”.

Особо важным и пока недостаточно изученным эффектом ЖАК является способность влиять на экспрессию генов большой группы регуляторных белков, необходимых для устойчивости растений к действию стрессоров: NAC, MYB, WRKY и других [125].

ЖАК способна индуцировать как относительно специфические, так и универсальные адаптивные реакции, в частности, влиять на редокс-гомеостаз и усиливать работу антиоксидантной системы. При этом особое значение может иметь активация жасмонатами вторичного метаболизма, что приводит к усилению синтеза фенольных соединений, в частности, флавоноидов и прочих метаболитов с антиоксидатными, мембранопротекторными и другими защитными функциями.

Помимо реакций, которые реализуются на молекулярном (биохимическом) уровне (например, индуцирование антиоксидантной системы), ЖАК и ее производные регулируют процессы, реализующиеся на уровне целого организма. К ним относится устьичные реакции. В их регуляции ЖАК и другие оксилипины, а также компоненты жасмонатного сигналинга могут иметь очень большое значение. Как уже отмечалось, отдельные оксилипины вызывают эффект закрывания устьиц в очень низких концентрациях [3]. ЖАК может индуцировать синтез АБК и устьичная реакция может быть опосредована именно этим гормоном [164]. С другой стороны, в реализации эффектов АБК (в том числе устьичных) принимает участие важный компонент жасмонатного сигналинга – транскрипционный фактор JIN1/MYC2 [69].

Ключевая роль ЖАК и ее производных в адаптации растений к стрессорам различной природы позволяет рассматривать их как перспективный инструмент для использования в растениеводстве. Привлекательным в этом отношении представляется очень широкий диапазон концентраций, в которых экзогенные ЖАК и Ме-ЖАК оказывают на растения стресс-протекторное влияние, индуцируя защитные системы (табл. 1). Широкий диапазон нетоксичных доз ЖАК и ее производных снижает вероятность передозировки при практическом применении. Однако пока использование ЖАК и ее производных в растениеводстве сдерживается их высокой стоимостью. В настоящее время ЖАК и ее производные применяются преимущественно для коррекции физиологического состояния растений, выращиваемых в основном в защищенном грунте. В то же время удешевление синтеза ЖАК создаст возможности для широкого их применения при выращивании полевых культур, особенно в неблагоприятных условиях. Кроме того, есть основания полагать, что интенсивное накопление данных о механизмах влияния ЖАК на ключевые регуляторные и протекторные системы растений, а также сведений о роли компонентов жасмонатного сигналинга в реализации эффектов других сигнальных молекул создаст новые теоретические предпосылки для целенаправленного повышения устойчивости культурных растений к действию стрессоров различной природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wang J., Song L., Gong X., Xu J., Li M.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. Art. 1446. https://doi.org/10.3390/ijms21041446
2. *Savchenko T., Kolla V.A., Wang C.-Q., Nasafi Z., Hicks D.R., Phadungchob B., Chehab W.E., Brandizzi F., Froehlich J., Dehesh K.* // Plant Physiol. 2014. V. 164. № 3. P. 1151–1160.
3. *Савченко Т.В., Застрижная О.М., Климов В.В.* // Биохимия. 2014. Т. 79. № 4. С. 458–475.
4. *Gomi K.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. https://doi.org/10.3390/ijms21041261

5. *Ali M.S., Baek K.-H.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 2. Art. 621. https://doi.org/10.3390/ijms21020621
6. *Jang G., Yoon Y., Choi Y.D.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 1. https://doi.org/10.3390/ijms21010305
7. *Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л.* // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 5. С. 643–653.
8. *Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., Cheng J., Zhang K.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 10 https://doi.org/10.3390/ijms20102479
9. *Lamattina L., Garcia-Mata C.* // Gasotransmitters in Plants, Signaling and Communication in Plants. / Eds. L. Lamattina, C. Garcia-Mata. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. P. 5–9.
10. *Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasniy S.P., Dmitriev A.P.* // Cytol. Genet. 2019. V. 53. № 5. P. 392–406.
11. *Feussner I.; Wasternack C.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 275–297.
12. *Agrawal G.K., Tamogami S., Han O., Iwahashie H., Rakwal R.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 317. № 1. P. 1–15.
13. *Wasternack C., Hause B.* // Ann. Bot. 2013. V. 111. № 6. P. 1021–1058.
14. *Huang H., Liu B., Liu L., Song S.* // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. № 6. P. 1349–1359.
15. *Wang F., Yu G., Liu P.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 390. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00390
16. *Maynard D., Groger H., Dierks T., Dietz K.J.* // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. № 22. P. 5341–5354.
17. *Santino A., Taurino M., De Domenico S., Bonsegna S., Poltronieri P., Pastor V., Flors V.* // Plant Cell Rep. 2013. V. 32. P. 1085–1098.
18. *Koch T., Bandemer K., Boland W.* // Helv. Chim. Acta. 1997. V. 80. № 3. P. 838–850.
19. *Li J., Zhang K., Meng Y., Hu J., Ding M., Bian J., Yan M., Han J., Zhou M.* // Plant J. 2018. V. 95. № 3. P. 444–457.
20. *Suza W.P., Rowe M.L., Hamberg M., Staswick P.E.* // Planta. 2010. 231. № 3. P. 717–728.
21. *Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., PorzelA., Kramell R., Miersch O., Wasternack C., SolanoR.* // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5. № 5. P. 344–350.
22. *Thorpe M.R., Ferrieri A.P., Herth M.M., Ferrieri R.A.* // Planta. 2007. V. 226. № 2. P. 541–551.
23. *Heil M., Ton J.* // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. № 6. P. 264–272.
24. *Farmer E.E., Ryan C.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 19. P. 7713–7716.
25. *Li Q., Zheng J., Li S., Huang G., Skilling S.J., Wang, L., Li L., Li M., Yuan L., Liu P.* // Mol. Plant. 2017. V. 10. P. 695–708.
26. *Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A., Browse J.* // Nature. 2007. V. 448. № 7154. P. 661–666.
27. *Melotto M., Mecey C., Niu Y., Chung H.S., Katsir L., Yao J., Zeng W., Thines B., Staswick P., Browse J.* // Plant J. 2008. V. 55. № 6. P. 979–988.
28. *Sewell J., Gil E.* // Nature. 2010. V. 464. № 7289. P. 788–791.
29. *Schmiesing A., Emonet A., Gouhier-Darimont C., Reymond P.* // Plant Physiol. 2016. V. 170. № 4. P. 2432–2443.
30. *Nuruzzaman M., Sharoni A.M., Kikuchi S.* // Front. Microbiol. 2013. V. 4. Art. 248. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248
31. *Lorenzo O., Piqueras R., Sánchez-Serrano J.J., Solano R.* // Plant Cell. 2003. V. 15. № 1.165–178.
32. *Pré M., Atallah M., Champion A., de Vos M., Pieterse C.M.J., Memelink J.* // Plant Physiol. 2008. V. 147. № 3. P. 1347–1357.
33. *Li J., Zhong R., Palva E.T.* // PLoS ONE. 2017. V. 12. e0183731.
34. *Sun Q.-P., Yu Y.-K., Wan S.-X., Zhao F.-K., Hao Y.-L.* // Agricult. Sci. China. 2010. V. 9. № 4. P. 497–503.
35. *Leon J., Rojo E., Titarenko E., Sanchez-Serrano J.J.* // Mol. Gen. Genet. 1998. V. 258. P. 412–419.
36. *Fauriea B., Cluzeta S., Merillon J.M.* // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. № 17. P. 1863–1877.
37. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Обозный А.И.* // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 3. С. 367–375.
38. *Suhita D., Kolla V.A., Vavasseur A., Raghavendra A.S.* // Plant Sci. 2003. V. 164. № 4. P. 481–488.
39. *Hsu Y.Y., Chao Y.Y., Kao C.H.* // J. Plant Physiol. 2013. V. 170. № 1. P. 63–69.
40. *Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Максимов И.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 5. С. 602–608.
41. *Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Lüthje S., Vylegzha-nina N., Buck F., Böttger M.* // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. № 5. P. 497–508.
42. *Шарова Е.И., Медведев С.С.* // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 1. С. 3–18.
43. *Berna A., Bernier F.* // Plant Mol. Biol. 1999. V. 39. № 3. P. 539–549.
44. *Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M.J., Durner J.* // Planta. 2004. V. 218. № 6. P. 938–946.
45. *Hsu Y.Y., Kao C.H.* // Crop Environ. Bioinformatics. 2012. V. 9. P. 160–167.
46. *Shan C., Zhou Y., Liu M.* // Protoplasma. 2015. V. 252. № 5. P. 1397–1405.
47. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Косаковская И.В.* // Физиология растений и генетика. 2016. Т. 48. № 2. С. 158–166.
48. *Munemasa S., Mori I.C., Murata Y.* // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6. № 7. P. 939–941.
49. *Noriega G., Cruz D.S., Batlle A., Tomaro M., Balestrasse K.* // J. Plant Growth Regul. 2012. V. 31. P. 79–89.
50. *Колесников Я.С., Кретинін С.В.* // Допов. Нац. акад. наук Укр. 2018. № 10. С. 95–102.

51. *Zalabák D., Pospisilová H., Smehilová M., Mrizová K., Frebort I., Galuszka P.* // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. № 1. P. 97–117.

52. *Liu L., Li H., Zeng H., Cai Q., Zhou X., Yin C.* // J. Plant Growth Regul. 2016. V. 35. № 2. P. 366–376.

53. *Jang G., Chang S.H., Um T.Y., Lee S., Kim J.-K., Do Choi Y.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 10212. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10634-1

54. *Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Maslennikova D.R., Yuldashev R.A., Allagulova C.R., Lastochkina O.V.* // Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants / Eds. N.A. Khan., R. Nazar, N. Iqbal, N.A. Anjum. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. P. 18 –228.

55. *Merewitz E.B., Du H., Yu W., Liu Y., Gianfagna T., Huang B.* // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 3. P. 1315–1328.

56. *Frebort I., Kowalska M., Hluska T., Frebortova J., Galuszka P.* // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 8. P. 2431–2452.

57. *Avalbaev A., Yuldashev R., Fedorova K., Somov K., Vysotskaya L., Allagulova C., Shakirova F.* // J. Plant Physiol. 2016. V. 191. P. 101–110.

58. *Battal P., Erez M.E., Turker M., Berber I.* // Ann. Bot. Fenn. 2008. V. 45. № 3. P. 173–185.

59. *Schäfer M., Meza-Canales I.D., Navarro-Quezada A., Brütting C., Vanková R., Baldwin I.T., Meldau S.* // J. Integr. Plant Biol. 2015. V. 57. № 2. P. 198–212.

60. *Hou X., Lee L.Y.C., Xia K., Yan Y., Yu H.* // Dev. Cell. 2010. V. 19. № 6. P. 884–894.

61. *Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N.P.* // Science. 2006. V. 311. № 5757. P. 91–94.

62. *Mahonen A.P., Ten Tusscher K., Siligato R., Smetana O., Diaz-Trivino S., Salojarvi J., Wachsman G., Prasad K., Heidstra R., Scheres B.* // Nature. 2014. V. 515. № 7525. P. 125–129.

63. *Shan C., Wang T., Zhou Y., Wang W.* // Biol. Plant. 2018. V. 62. P. 188–193.

64. *Banerjee A., Tripathi D.K., Roychoudhury A.* // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 132. P. 46–53.

65. *Simontacchi M., Garcia-Mata C., Bartoli C.G. Santa-María G.E., Lamattina L.* // Plant Cell Rep. 2013. V. 32. № 6. P. 853–866.

66. *Scheler C., Durner J., Astier J.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2013. V. 16. № 4. P. 534–539.

67. *Barrera-Ortiz S., Garnica-Vergara A., Esparza-Reynoso S., García-Cárdenas E., Raya-González J., Ruiz-Herrera L.F., López-Bucio J.* // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 438–451.

68. *Li H., Li M., Wei X., Zhang X., Xue R., Zhao Y., Zhao H.* // Mol. Genet. Genomics. 2017. V. 292. № 5. P. 1091–1110.

69. *Ton J., Flors V., Mauch-Mani B.* // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. № 6. P. 310–317.

70. *Palmieri M.C., Sell S., Huang X., Scherf M., Werner T., Durner J., Lindermayr C.* // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. № 2. P. 177–186.

71. *Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Дмитриев А.П.* // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 2. С. 142–150.

72. *Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Шкляревский М.А., Дмитриев А.П.* // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 5. С. 482–489.

73. *Cheng T., Hu L., Wang P., Yang X., Peng Y., Lu Y., Chen J., Shi J.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 188. https://doi.org/10.3390/ijms19010188

74. *Shoji T., Hashimoto T.* // Plant Cell Physiol. 2011. V. 52. № 6. P. 1117–1130.

75. *Zhang H.B., Bokowiec M.T., Rushton P.J., Han S.C., Timko M.P.* // Mol. Plant. 2012. V. 5. № 1. P. 73–84.

76. *Lackman P., González-Guzmán M., Tilleman S., Carqueijeiro I., Pérez A.C., Moses T., Seo M., Kanno Y., Häkkinen S.T., Montagu M.C.E.V., Thevelein J.M., Maaheimo H., Oksman-Caldentey K.M., Rodriguez P.L., Rischer H., Goossens A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 14. P. 5891–5896.

77. *Lorenzo O., Chico J.M., Sanchez-Serrano J.J., Solano R.* // Plant Cell. 2004. V. 16. № 7. P. 1938–1950.

78. *Yadav V., Mallappa C., Gangappa S.N., Bhatia S., Chattopadhyay S.* // Plant Cell. 2005. V. 17. № 7. P. 1953–1966.

79. *Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.* // Plant Cell. 2003. V. 15. № 1. P. 63–78.

80. *Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P.* // Cytol. Genet. 2017. V. 51. № 5. P. 325–330.

81. *Adie B., Perez-Perez J., Perez-Perez M.M. Godoy M., Sánchez-Serrano J.J., Schmelz E.A., Solano R.* // Plant Cell. 2007. V. 19. № 5. P. 1665–1681.

82. *Sanchez-Romera B., Ruiz-Lozano J.M., Li G. Luu D.T., Martínez-Ballesta Mdel C., Carvajal M., Zamarreno A.M., García-Mina J.M., Maurel C., Aroca R.* // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. № 4. P. 995–1008.

83. *Wasternack C.* // Ann. Bot. 2007. V. 100. № 4. P. 681–697.

84. *Stenzel I., Hause B., Maucher H., Pitzschke A., Miersch O., Ziegler J., Ryan C.A., Wasternack C.* // Plant J. 2003. V. 33. № 3. P. 577–589.

85. *Stenzel I., Hause B., Miersch O. Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I., Wasternack C.* // Plant Mol. Biol. 2003. V. 51. № 6. P. 895–911.

86. *Kramell R., Miersch O., Atzorn R., Parthier B., Wasternack C.* // Plant Physiol. 2000. V. 123. № 1. P. 177–188.

87. *Kang D., Seo Y., Lee J.D., Ishii R., Kim K.U., Shin D.H., Park S.K., Lee I.* // J. Agron. Crop Sci. 2005. V. 191. № 4. P. 273–282.

88. *Ryu H., Cho Y.-G.* // J. Plant Biol. 2015. V. 58. P. 147–155.

89. *Walia H., Wilson C., Wahid A., Condamine P., Cui X., Close T.J.* // Funct. Integr. Genomics. 2005. V 6. № 2. P. 143–156.

90. *Abouelsaad I., Renault S.* // J. Plant Physiol. 2018. V. 226. P. 136–144.

91. *Du H., Liu H., Xiong L.* // Front. Plant Sci. 2013. V. 4:397. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00397

92. *Hu Y., Jiang L., Wang F., Yu D.* // Plant Cell. 2013. V. 25. № 8. P. 2907–2924.

93. *Xu Y.H., Liao Y.C., Zhang Z., Liu J., Sun P.W., Gao Z.H., Sui C., Wei J.H.* // Sci. Rep. 2016. V. 6.21843. https://doi.org/10.1038/srep21843

94. *Balfagon D., Sengupta S., Gomez-Cadenas A., Fritschi F.B., Azad R.K., Mittler R., Zandalinas S.I.* // Plant Physiol. 2019. V. 181. № 4. P. 1668–1682.

95. *Walia H., Wilson C., Condamine P., Liu X., Ismail A.M., Close T.J.* // Plant Cell Environ. 2007. V. 30. № 4. P. 410–421.

96. *Яковлева В.Г., Егорова А.М., Тарчевский И.А.* // Доклады АН. 2013. Т. 449. № 2. С. 236–239.

97. *Hu Y., Jiang Y., Han X., Wang H., Pan J., Yu D.* // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. № 6. P. 1361–1369.

98. *Sharma M., Laxmi A.* // Front Plant Sci. 2015. V. 6. 1129. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01129

99. *Игнатенко А.А., Таланова В.В., Репкина Н.С., Титов А.Ф.* // Труды Карельского научного центра РАН. 2020. № 3. С. 121–129.

100. *Wang C.Y., Buta G.* // Environ. Exp. Bot. 1994. V. 34. № 4. P. 427–432.

101. *González-Aguilar G.A., Fortiz J., Cruz R., Baez R., Wang C.Y.* // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. № 2. P. 515–519.

102. *González-Aguilar G.A., Tiznado-Hernández M.E., Zavaleta-Gatica R., Martínez-Téllez M.A.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 313. № 3. P. 694–701.

103. *Dar T.A., Moin U., Khan M.M.A., Hakeem K.R., Jaleel H.* // Environ. Exp. Bot. 2015. V. 115. P. 49–57.

104. *Sayyari M., Babalar M., Kalantari S., Martínez-Romero D., Guillén F., Serrano M., Valer D.* // Food Chem. 2011. V. 124. № 3. P. 964–970.

105. *Jin P., Zheng Y., Tang S., Rui H., Wang C.Y.* // Postharvest Biol. Technol. 2009. V. 52. № 1. P. 24–29.

106. *Jin P., Duan Y., Wang L., Wang J., Zheng Y.* // Food Bioprocess Technol. 2014. V. 7. P. 2259–2266.

107. *Koshiyama M., Watanabe K., Fujisawa H., Mitomi M., Imamura K.* // Plant Growth Dev. 2006. V. 41. P. 24–33.

108. *Wang S.Y.* // J. Plant Growth Regul. 1999. V. 18. № 3. P.127–134.

109. *Alam M.M., Nahar K., Hasanuzzaman M., Fujita M.* // Plant Biotechnol. Rep. 2014. V. 8. P. 279–293.

110. *Ge Y.X., Zhang L.J., Li F.H., Chen Z.B., Wang C., Yao Y.C., Han Z.H., Zhang J., Shi Z.S.* // Afr. J. Agric. Res. 2010. V. 5. № 15. P. 1978–1983.

111. *Безрукова М.В., Лубянова А.Р., Масленникова Д.Р., Васильев И.Д., Шакирова Ф.М.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 553–558.

112. *Abdelgawad Z.A., Khalafaallah A.A., Abdallah M.M.* // Agric. Sci. 2014. V. 5. № 12. P. 1077–1088.

113. *Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Луговая А.А., Дмитриев А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 4. С. 412–416.

114. *Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Дмитриев А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 223–229.

115. *Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Shvidenko N.V., Dmitriev A.P.* // Ukr. Biochem. J. 2018. V. 90. № 5. P. 50–59.

116. *Qiu Z.B., Guo J.L., Zhu A.J., Zhang L., Zhang M.M.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2014. V. 104. P. 202–208.

117. *Shahzad A.N., Pitann B., Ali H., Qayyum M.F., Fatima A., Bakhat H.F.* // J. Agron. Crop Sci. 2015. V. 201. P. 443–451.

118. *Jiang M., Xu F., Peng M., Huang F., Meng F.* // Acta Physiol. Plant. 2016. V. 38. 106. doi org/ https://doi.org/10.1007/s11738-016-2120-z

119. *El-Sayed O.M., El-Gammal O.H.M., A Salama.S.M.* // Sci. Horticult. 2014. V. 176. P. 32–37.

120. *Poonam S., Kaur H., Geetika S.* // Amer. J. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 817–823.

121. *Yan Z., Zhang W., Chen J., Li X.* // Biol. Plant. 2015. V. 59. P. 373–381.

122. *Yan Z., Chen J., Li X.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2013. V. 98. P. 203–209.

123. *Ali E., Hussain N., Shamsi I.H., Jabeen Z., Siddiqui M.H., Jiang L.X.* // J. Zhejiang Univ. Sci. B. (Biomed. Biotechnol.). 2018. V. 19. № 2. P. 130-146.

124. *Mir M.A., Sirhindi G., Alyemeni M.N., Alam P., Ahmad P.* // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 1195–1209.

125. *Кузнецов В.В.* // Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты. Материалы Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. участием. Томск: Издательский Дом Томск. гос. ун-та, 2018. С. 12–15.

126. *Desikan R., Cheung M.K., Bright J., Henson D., Hancock J.T., Neill S.J.* // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. № 395. P. 205–212.

127. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Кабашникова Л.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 419–440.

128. *Liu X., Chi H., Yue M., Zhang X., Li W., Jia E.* // Plant Growth Regul. 2012. V. 31. P. 436–447.

129. *Ma C., Wang Z.Q., Zhang L.T., Sun M.M., Lin T.B.* // Photosynthetica. 2014. V. 52. № 3. P. 377–385.

130. *Kumari G.J., Reddy A.M., Naik S.T., Kumar S.G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P.C., Sudhakar C.* // Biol. Plant. 2006. V. 50. № 2. P. 219–226.

131. *Shana C., Liang Z.* // Plant Sci. 2010. V. 178. P. 130–139.

132. *Максимов И.В., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сурина О.Б., Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г.* // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 2. С. 243–251.

133. *Sirhindi G., Mir M.A., Abd-Allah E.F., Ahmad P., Gucel S.* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Art. 591. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00591

134. *Ahmad P., Alyemeni M.N., Vijaya L., Alam P., Ahanger M.A., Alamri S.A.* // Archives Agron. Soil Sci. 2017. V. 63. № 13. P. 1889–1899.

135. *Azeem U.* // Russ. Agric. Sci. 2018. V. 44. № 3. P. 209–215.

136. *Leon-Cisneros S., Quirola-Garcés A., Alvarez-Santana J., Barriga-Medina N., Ramirez-Villacís D., Caviedes M., Ramirez-Cárdenas L., Leon-Reyes A.* // Cereal Res. Commun. 2019. V. 47. № 4. P. 604–614.

137. *Yan Z., Chen J., Li X.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2013. V. 98. P. 203–209.

138. *Farooq M.A., Gill R.A., Islam F., Ali B., Shu J., Liu H., He S., Zhou W.* // Front Plant Sci. 2016. V. 7. Art. 468. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00468

139. *Kaur H., Sirhindi G., Sharma P.* // J. Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 9. № 4. P. 36–42

140. *Sharma A., Kumar V., Huwei Y., Kanwar M.K., Bhardwaj R., Kumar A.T., Zheng B.* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Art. 1609. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01609

141. *Coelho D.G., Andrade M.H., Marinato C. S., Araujo S.C., de Matos L.P. da Silva V.M., de Oliveira J.A.* // Acta Physiol. Plant. 2020. V. 42. Art. 97 https://doi.org/10.1007/s11738-020-03086-0

142. *Sheyhakinia S., Bamary Z., Einali A., Valizadeh J.* // Biologia. 2020. V. 75. P. 681–692.

143. *Guo J., Pang Q., Wang L., Yu P., Li N., Yan X.* // Proteome Sci. 2012. V. 10. № 1. P. 1–13.

144. *Dombrecht B., Xue G.P., Sprague S.J., Kirkegaard J.A., Ross J.J., Reid J.B., Fitt G.P., Sewelam N., Schenk P.M., Manners J.M., Kazan K.* // Plant Cell. 2007. V. 19. № 7. P. 2225–2245.

145. *Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Фесенко А.Н., Широкова А.В., Загоскина Н.В.* // С.-х. биология. 2015. Т. 50. № 5. С. 611–619.

146. *Радюкина Н.Л., Михеева Л.Е., Карбышева Е.А.* // Успехи соврем. биологии. 2019. Т. 139. № 3. С. 254–266.

147. *Szabados L., Savoure A.* // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. № 2. P. 89–97.

148. *Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F.* // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 19. № 9. P. 998–1011.

149. *Sheteawi S.A.* // Int. J. Agri. Biol. 2007. V. 9. № 3. P. 473–478.

150. *Zhao M.L., Wang J.N., Shan W., Fan J.G., Kuang J.F., Wu K.Q., Li X.P., Chen W.X., He F.Y., Chen J.Y., Lu W.J.* // Plant Cell Environ. 2013. V. 36. № 1. P. 30–51.

151. *Ahmad R.M., Cheng C., Sheng J., Wang W., Ren H., Aslam M., Yan Y.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 24. Art. 6202. https://doi.org/10.3390/ijms20246202

152. *Savchenko T.V., Rolletschek H., Dehesh K.* // Plant Cell Physiol. 2019. V. 60. № 12. P. 2613–2620.

153. *Garcia A.B. Engler J., Iyer S., Gerats T., Van Montagu M., Caplan A.B.* // Plant Physiol. 1997. V. 115. № 1. P. 159–169.

154. *Bita C.E., Gerats T.* // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. Art. 273. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273

155. *Yoshida M., Kawakami A.* // Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World / Eds. R. Imai, M. Yoshida, N. Matsumoto. New York: Springer Science + + Business Media, 2013. P. 231–243.

156. *Caffery M., Tonseca V., Carl Leopold A.* // Plant Physiol. 1988. V. 86. № 3. P. 754–758.

157. *Аверьянов А.А., Лапикова В.П.* // Биохимия. 1989. Т. 54. № 10. С. 1646–1651.

158. *Ramel F., Sulmon C., Bogard M., Couée I., Gouesbet G.* // BMC Plant Biol. 2009. V. 9. 28. https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-28

159. *Chen Y., Pang Q., Dai S., Wang Y., Chen S., Yan X.* // J. Plant Physiol. 2011. V. 168. № 10. P. 995–1008.

160. *Аллагулова Ч.Р., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 307–311.

161. *Sharma M., Laxmi A.* 2016. // Front. Plant Sci. V. 6. Art. 1129. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01129

162. *Chen J., Yan Z., Li X.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2014. V. 104. P. 349–356. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.022

163. *Montillet J.L., Leonhardt N., Mondy S., Tranchimand S., Rumeau D., Boudsocq M., Garcia A.V., Douki T., Bigear J., Lauriere C., Chevalier A., Castresana C., Hirt H.* // PLOS Biol. 2013. V. 11. № 3: e1001513.

164. *de Ollas C., Dodd I.C.* // Plant Mol. Biol. 2016. V. 91. P. 641–650.

165. *Suhita D., Raghavendra A.S., Kwak J.M., Vavasseur A.* // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 4. P. 1536–1545.

166. *Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Дмитриев А.П.* // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2017. № 3 (42). С. 72–80.

167. *Liu X., Shi W., Zhang S., Lou C.* // Chinese Sci. Bull. 2005. V. 50. № 6. P. 520–525.

168. *Munemasa S., Oda K., Watanabe-Sugimoto M., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y.* // Plant Physiol. 2007. V. 143. № 3. P. 1398–1407.

169. *Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Horielova E.I., Dmitriev A.P.* // Cytol. Genet. 2018. V. 52. № 6. P. 400–405.

170. *Munns R.* // Plant Cell Environ. 2002. V. 25. № 2. P. 239–250.

171. *Веселов Д.С., Маркова И.В., Кудоярова Г.Р.* // Успехи соврем. биологии. 2007. Т. 127. № 5. С. 482–493.

172. *Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Shkliarevskyi M.A., Dyachenko A.I., Dmitriev A.P.* // Cytol. Genet. 2020. V. 54. № 4. P. 318–323.

173. *Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R., Kazan K.* // Plant Cell. 2004. V. 16. № 12. P. 3460–3479.

Jasmonate Signaling and Plant Adaptation to Abiotic Stresses (Review)

Yu. E. Kolupaev[a], * and T. O. Yastreb[a]

[a] *Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, 62483 Ukraine*

**e-mail: plant.biology.knau@gmail.com*

The role of jasmonic acid (JA) and jasmonate signaling in regulation of plant adaptive responses to action of stressors is reviewed. The synthesis of JA in plants and the main pathway for the transduction of jasmonate signal are briefly described. The effect of JA on cellular content of other signaling messengers (calcium ions, reactive oxygen species, nitric oxide, hydrogen sulfide, and carbon monoxide) is surveyed. For the first time, data on the participation of jasmonate signaling components (in particular, COI1 and JIN1/MYC2 proteins) in the physiological effects of signaling mediators-gasotransmitters are summarized. Information is provided on the change in endogenous content of JA under action of stressors, and the effect of exogenous JA and its derivatives on plant resistance. The spectrum of jasmonate-dependent defense reactions of plants and the mechanisms of their induction are analyzed. Particular attention is paid to the role of JA in activation of antioxidant system and regulation of stomata under stress conditions.

Keywords: jasmonic acid, methyl jasmonate, signaling, reactive oxygen species, nitric oxide, hydrogen sulfide, carbon monoxide, abscisic acid, plant adaptive responses

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 24–35

УДК 579.26,579.64

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХСЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ, НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ (ОБЗОР)

© 2021 г. И. С. Сазыкин[1], Л. Е. Хмелевцова[1], Е. Ю. Селиверстова[1], М. А. Сазыкина[1, *]

[1]Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: samara@sfedu.ru

Поступила в редакцию 30.03.2020 г.
После доработки 26.08.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

В настоящее время антибиотики крайне широко используются в животноводстве. Из-за избыточного и неправильного их использования они становятся причиной стремительного распространения генов антибиотикорезистентности (АРГ), а также антибиотикорезистентных бактерий (АРБ) в микробных сообществах окружающей среды. В обзоре рассмотрены работы, посвященные использованию антибиотиков в животноводстве, передаче АРГ и АРБ от животных к человеку и их распространению в окружающей среде со стоками животноводческих предприятий, потоками воды и воздуха. Также проанализирована роль навоза как резервуара АРГ, влияние обработки и хранения навоза на численность и разнообразие АРБ и АРГ, а также затронуты вопросы, связанные с присутствием АРГ и АРБ в продуктах животноводства и растениеводства и их поступлением в микробиом человека с пищей.

Ключевые слова: гены устойчивости к антибиотикам, антибиотикорезистентность, бактерии, резистентные к антибиотикам, животноводство, навоз, почвенный резистом

DOI: 10.31857/S0555109921010335

Открытие антибиотиков (**АБ**) стало одним из величайших прорывов в медицинской микробиологии, которое в корне изменило терапию бактериальных инфекционных заболеваний. Антибиотики не только широко используются в медицине, но и стали неотъемлемой частью современного сельского хозяйства и животноводства [1]. Однако из-за чрезмерного и неправильного использования противомикробных препаратов в данной отрасли, резко возросло число резистентных изолятов патогенных бактерий, что ставит под угрозу эффективность АБ как терапевтических средств. Это привело к глобальному кризису в области здравоохранения, угрожающему возвращением эпохи, предшествующей их открытию [2, 3].

В последние годы в связи с увеличением распространения бактерий с множественной лекарственной устойчивостью и сокращением числа АБ, эффективных против патогенных бактерий, возрос интерес к резистому микробных сообществ окружающей среды как потенциальному резервуару новых генов устойчивости [4]. Необходимо отметить, что природный резистом изначально содержит гены антибиотикорезистентности (Antibiotic Resistance Gene, ARG, **АРГ**) ко всем уже применявшимся, вновь открытым и даже еще не известным АБ природного происхождения, так как они вырабатываются различными популяциями почвенных микроорганизмов, включая бактерии, грибы и актиномицеты [5].

Присутствие генов устойчивости к АБ – это древнейшая особенность микроорганизмов, существовавшая на земле за миллионы или миллиарды лет до того, как был открыт первый АБ. Ады-Оппонг с соавт. [6] утверждают, что АБ, как и гены резистентности к ним, вероятно, естественным образом эволюционировали в природных микробных сообществах как средства сигналинга и обороны на протяжении миллиардов лет. Именно из природных микробиомов происходит генетический материал, определяющий устойчивость к АБ. Но из антропогенных источников обратно в окружающую среду возвращаются уже “усовершенствованные” АРГ, подвергшиеся адаптивной эволюции в результате значительного селективного давления медицинского, ветеринарного и сельскохозяйственного применения АБ [7]. Таким образом функционирует “круговорот” мобильного резистома.

В настоящее время АРГ признаны новым классом антропогенных биологических поллютантов [8, 9], которые способны накапливаться в окружающей среде и представлять угрозу для здоровья человека. Антибиотикорезистентные бактерии (Antibiotic Resistance Bacteria, ARB, **АРБ**) и АРГ обычно обнаруживают в отходах после использования концентрированных кормов для сельскохозяйственных животных, стоках животноводческих предприятий и навозе животных, поступающих часто непосредственно в почву и воду, а также в бытовых и больничных стоках, сбрасываемых в канализацию, которые в конечном итоге также попадают в окружающую среду [10–12]. АРГ от человека и животных затем распространяются в бактериальных сообществах, присутствующих в окружающей среде [13–16].

Распространение антропогенно селекционированных АРГ происходит различными путями, включающими взаимодействия между людьми, животными и микробиомами окружающей среды. Сельскохозяйственные животные являются одним из ключевых звеньев этой системы, так как их постоянно подвергают воздействию широкого спектра антибиотиков в больших количествах [17]. Несмотря на то, что сельскохозяйственные микробные сообщества являются как потенциальным источником АРГ, так и средством их переноса, эта проблема недостаточно исследована, чтобы адекватно оценить роль агромикробиоценоза в распространении антропогенного резистома [4, 18].

Использование антибиотиков в животноводстве. Человеческая популяция непрерывно растет высокими темпами, что заставляет сельскохозяйственную отрасль постоянно увеличивать производство [19]. В результате АБ стали обязательным компонентом современных кормов для сельскохозяйственных животных [20].

По оценкам работы [21], около 80% всех АБ, продаваемых в США, используются в животноводстве и аквакультурах. Их обычно применяют для ускорения набора живого веса и профилактики заболеваний (кормовые АБ), а также лечения инфекций (ветеринарные АБ).

Китай также является крупнейшей в мире страной-потребителем АБ (162000 т/г), причем более половины – 84000 т/г приходится на животноводство и птицеводство [22]. За тот же период времени, в животноводстве США в качестве профилактических средств было использовано ~14500 т антибиотиков [23]. В странах Европейского союза (ЕС) в 2012 году было израсходовано около 8046 т ветеринарных противомикробных препаратов [24].

Точные данные по России не известны, но согласно данным мониторинга, размещенным на сайте маркетинговой компании “Research Techart”, ежегодное использование АБ в животноводстве составляет около 3500 т, из которых порядка 19% – в качестве стимуляторов роста, а 22% – как профилактические средства (https://research.techart.ru/publication/556.htm).

Использование АБ в животноводстве и птицеводстве в качестве кормовых добавок значительно увеличилось в последние десятилетия [26]. По существующим прогнозам, использование противомикробных препаратов в животноводстве в целом в мире к 2030 г увеличится на 67%, а в странах БРИКС (Бразилия, Россия, Индия, Китай и Южная Африка) в период между 2010 и 2030 годами – на 99% [19].

Именно селективное давление, связанное с сельскохозяйственным применением АБ, определяет распространение АРБ в продуктах животноводства и потенциально контаминирует пищу на всем ее пути от фермы к конечному потребителю [27]. Таким образом, злоупотребления и неправильное использование антибиотиков в сельском хозяйстве и животноводстве, вероятно, являются одними из основных причин усиления устойчивости бактерий к лекарственным средствам [28]. Особую роль играет ветеринарное применение АБ при их использовании для лечения заболеваний, опасных также для человека [20, 29].

АБ используются в животноводстве в качестве профилактических средств для предотвращения заболеваний у здоровых животных и терапевтических средств для лечения заболевших, а также средств для предотвращения распространения заболеваний в группе животных [20, 30, 31]. При терапевтическом и метафилактическом применении используются одни и те же препараты в аналогичных терапевтических дозах. Разница заключается лишь в том, что в первом случае АБ применяются для лечения заведомо больных животных, а во втором – препараты получают животные без клинических проявлений инфекционного заболевания, содержащиеся в группе, в которой были выявлены больные животные, для предотвращения распространения инфекции. Профилактическое применение антибиотиков происходит в группах здоровых животных, потенциально подверженных опасности бактериальных заболеваний. Примерами профилактического применения АБ являются обработка групп молодняка при прекращении молочного вскармливания, молочного скота при завершении периода лактации для предотвращения мастита, смешанных групп при транспортировке, а также при объединении животных из разных стад или с разных ферм, при ветеринарных хирургических вмешательствах. Критерием метафилактического и профилактического применения АБ является то, что расходы на лечение заболевших животных и потенциальные потери продук-

ции животноводства могут многократно превысить расходы на превентивную обработку [32].

Антибиотики, используемые в ветеринарных, метафилактических и профилактических целях в животноводстве по большей части те же самые, либо относятся к тому же классу препаратов, что и медицинские антибиотики. В мире в 2009 году тремя наиболее используемыми классами АБ были макролиды, β-лактамные АБ и тетрациклины [33]. Эти же три класса препаратов критически важны для лечения человека. Кроме этих АБ, для лечения животных и метафилактики также применяют аминогликозиды, комбинацию сульфонамидов и триметоприма, фторхинолоны, цефалоспорины, амфениколы, линкозамиды, полипептиды, нитрофураны, стероидные антибиотики, полиеновые антибиотики и плевромутилины [32]. Лишь около 37% антибактериальных средств (включая ионофоры) в животноводстве, не имеют аналогичных препаратов для медицинского использования [34].

Применение АБ в качестве стимуляторов роста животных основано на том, что при добавлении в ультранизких дозах в корма для сельскохозяйственных животных увеличивается прирост живого веса. Выгода от такого применения АБ была значительно переоценена в исследованиях, проведенных до 1980 гг., которые показали рост эффективности использования кормов от 5 до 15%. Позже эффективность оценивалась гораздо ниже – от 1 до 5% [33]. В качестве стимуляторов роста используют, в первую очередь, макролиды, стрептограмины и пептидные антибиотики [32].

До настоящего времени во многих странах в качестве стимуляторов роста животных используются такие критически важные для медицинского применения классы АБ, как макролиды, полимиксины, аминогликозиды и цефалоспорины третьего поколения [24]. При этом дозировка вышеперечисленных препаратов гораздо ниже терапевтической и профилактической, однако постоянное воздействие их сублетальных количеств приводит к быстрому и эффективному формированию и распространению устойчивых штаммов микроорганизмов. Использование АБ в субингибирующих концентрациях является фактором, способствующим в значительной степени распространению АРГ, так как было установлено, что сублетальные концентрации АБ дестабилизируют бактериальный геном, что может привести к повышению вирулентности и/или увеличению диссеминации генетического материала, связанного с резистентностью [35].

Наиболее последовательно и успешно с применением кормовых АБ борется ЕС. В 1996 г. было запрещено применение гликопептида авопарцина, а с января 1999 г. – еще шесть таких антимикробных стимуляторов роста, как макролиды, стрептограмины, полипептидный АБ Zn-бацитрацин, хиноксалин, карбадокс и олахиндокс. После этого несколько лет в ЕС были разрешены к применению только четыре вещества: флавофосфолипол, монензин-Na, салиномицин-Na и авиламицин. И, наконец, с 2006 г. в ЕС было полностью запрещено применение антибактериальных веществ в качестве стимуляторов роста [32, 33].

В 2011 и 2013 годах Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (**FDA**) выпустило добровольные для исполнения указания по прекращению использования к концу 2016 г. важных с медицинской точки зрения антибиотиков в качестве стимуляторов роста. Новые правила исключают использование важных, с медицинской точки зрения, антибиотиков для стимуляции роста и разрешают использовать эти препараты только в терапевтических или профилактических целях под наблюдением ветеринарного врача (www.fda.gov). В 2014 г. правительство Канады реализовало добровольную стратегию, аналогичную США. Мексика, Южная Корея и Новая Зеландия также запретили использование антибиотиков в качестве стимуляторов роста животных [33].

К сожалению, во многих развивающихся странах нет законодательства о применении противомикробных препаратов в животноводстве [24]. По оценкам Такур и Панда [33], в период с 2006 по 2050 гг. мировое потребление продуктов животного происхождения увеличится вдвое.

АРГ, механизмы возникновения и распространения антибиотикорезистентности в бактериальных популяциях. Резистентность бактерий к антибиотикам может быть достигнута при помощи таких основных механизмов, как: снижение проницаемости мембраны для антибиотиков; активное выведение АБ за пределы клетки (эффлюкс); их ферментативная инактивация; мутация гена, кодирующего мишень АБ; а также продукция бактерией альтернативных мишеней и образование бактериальных биопленок [36]. Набор механизмов резистентности при воздействии антибиотиков всегда один и тот же, вне зависимости от того, происходит это при лечении, или в процессе профилактики или метафилактики.

Гены резистентности содержатся в микроорганизмах-продуцентах АБ для защиты от собственных метаболитов. При мобилизации (встраивании в мобильные элементы генома) АРГ могут передаваться другим, в том числе неродственным бактериям, путем горизонтального переноса генетического материала. При смене хозяина, за счет мутаций может происходить оптимизация функциональной активности, применительно к особенностям метаболизма и физиологии новой клетки. Процесс адаптивной эволюции в различ-

ных хозяевах приводит к разнообразию функционально аналогичных генов, что ярко иллюстрирует пример генов, кодирующих эффлюксные системы тетрациклина [37].

Другим источником АРГ потенциально могут быть гены ферментов, участвующих в метаболизме бактериальной клетки. Под воздействием мутагенеза такие ферменты могут менять субстратную специфичность. Их новыми субстратами могут становиться АБ. Это хорошо видно на примере генов ацетил-, аденил- или фосфотрансфераз, определяющих устойчивость к аминогликозидам [38].

Мутировать могут также гены белков-мишеней, в результате чего мишени становятся устойчивы к ингибирующему действию АБ. Такой механизм лежит в основе устойчивости ДНК-топоизомераз к ингибирующему действию фторхинолонов [39] и быстрого возникновения рифампицин-резистентных мутантов [40].

Необходимо отметить, что если различные АБ имеют в бактериальной клетке один и тот же сайт-мишень, и продукт АРГ модифицирует этот сайт-мишень, то возникает перекрестная резистентность к структурно не связанным АБ. Так, гены семейства *erm*, локализованные на мобильных генетических элементах, способны вызывать перекрестную резистентность к макролидам, линкозамидам и β-стрептограминам [41].

В бактериальной популяции динамика устойчивости зависит от поступления АБ в среду, состояния резистома (совокупности АРГ), ранее существовавшего в данном микробном сообществе, активности горизонтального переноса генетического материала, а также перекрестной резистентности и функциональной активности АРГ у разных бактерий [32].

Неоднократное воздействие даже небольших количеств АБ приводит к селективному давлению на микробиом сельскохозяйственных животных, что дает преимущество резистентным штаммам. Кроме того, результатом селективного давления является усиление горизонтального переноса генетического материала, который позволяет бактериям получать от родственных и таксономически далеких микроорганизмов АРГ в составе мобильных генетических элементов (МГЭ). В результате количество резистентных штаммов в бактериальной популяции увеличивается, а чувствительные элиминируются антибиотиками. АРГ, определяющие резистентность к разным антибиотикам, часто локализованы в составе одного МГЭ и применение единственного АБ может привести к увеличению количества мультирезистентных штаммов. Усиление уровня резистентности нередко опосредовано не просто получением готовых генов резистентности, но и сочетанием новых мутаций с процессом горизонтального переноса. Также, в некоторых исследованиях было показано, что, хотя резистентные изоляты выделяли как от животных, так и от человека, ветеринарные изоляты показывали большую резистентность [24].

Распространение АРГ в микробиомах сельскохозяйственных животных, передача от животных к людям и загрязнение окружающей среды. Приобретённая устойчивость к АБ возникает у микроорганизмов, когда бактерии приобретают АРГ посредством мутации или, чаще, горизонтальной передачи генетического материала от бактерий того же, родственного или даже таксономически далекого вида. Передача может происходить тремя способами: конъюгация, трансдукция и трансформация [42]. При конъюгации АРГ переносятся из одной бактериальной клетки в другую в составе конъюгативных плазмид, конъюгативных транспозонов и геномных островов. При трансдукции генетический материал от одной бактерии к другой переносят, как правило, умеренные (лизогенные) бактериофаги, способные встраиваться в бактериальную хромосому. При переключении на литический сценарий они способны мобилизовать фрагменты хромосомы (включая АРГ). Остальные типы МГЭ переносят из клетки в клетку перечисленные выше конъюгативные элементы [43]. При трансформации (поглощении бактерией внеклеточной ДНК) участие МГЭ и вовсе не обязательно, но АРГ, интегрированные в мобилом, встраиваются в бактериальную ДНК гораздо эффективнее. Различные механизмы горизонтального переноса могут сочетаться – так, например, известны гибриды бактериофагов и плазмид [44].

Тесный контакт между бактериями в микробиомах, например на слизистой оболочке дыхательных путей или кишечного тракта, а также на коже людей и животных, значительно интенсифицирует горизонтальный перенос и является ключевым фактором быстрого распространения АРГ [32]. Горизонтальный перенос АРГ происходит независимо от того, находятся ли бактерии в микробиоме человека или животного. Также необходимо отметить, что в состав одного МГЭ могут входить несколько АРГ и, соответственно, один антимикробный агент, используемый исключительно в ветеринарии, может оказывать влияние на распространение бактериальных штаммов, устойчивых к АБ, критически важным для медицинского применения [32].

Резистентные бактерии могут передаваться от животных к человеку непосредственно через пищу (мясо, рыбу, яйца и молочные продукты и т. д.). Ряд вспышек пищевых инфекций, обусловленных устойчивыми к антибиотикам штаммами *Escherichia coli*, представителей родов *Enterococcus*, *Aeromonas*, а также различных видов сальмонелл, во всем мире был связан с пищевыми продуктами животного происхождения. Кроме того,

передача устойчивых штаммов между различными хозяевами (как между животным и человеком, так и между животными) может происходить при их непосредственном взаимодействии, при контакте с содержащими бактерии физиологическими субстанциями (слюна, фекалии, кровь и т.д.) или через окружающую среду (при поглощении загрязненного воздуха, воды или корма) [24, 33, 45].

Существует довольно много исследований, доказывающих, что сельскохозяйственные животные являются резервуарами АРБ [46–49]. Такие АРГ-содержащие бактерии можно найти в контаминированных мясных [50, 51] и молочных [52] продуктах. Следовательно, существует риск того, что клинически релевантные АРГ могут из зоонозных бактерий быть интегрированы в микробиом человека посредством горизонтального переноса генов (**ГПГ**) [29, 53].

При попадании в нового хозяина, резистентные бактерии могут внедряться в его микробиом и пребывать там достаточно продолжительное время. Но, даже в том случае, если микробиом нового хозяина элиминирует поступившие штаммы в течение непродолжительного времени, “пришлые” бактерии могут не только распространить свои АРГ среди комменсалов и патогенов нового микробиома, но и получить АРГ, уже присутствующие в нем [32]. Исследования плазмид и АРГ стафилококков человека и животных выявили идентичные АРГ, расположенные на идентичных плазмидах. Подобные исследования убедительно доказывают перенос плазмид между бактериями человека и животных.

Люди, которые часто контактируют с сельскохозяйственными животными, например, рабочие сельского хозяйства, подвергаются более высокому риску приобретения зоонозных АРБ [54]. Исследования подтвердили обмен клинически важными АРГ между работниками ферм и сельскохозяйственными животными [55, 56].

Количество резистентных бактерий в микробиомах кишечников фермеров, использующих АБ в качестве стимуляторов роста животных, значительно превышает их количество у населения в целом, а также у фермеров, которые их не используют. Кроме того, количество изолятов *Staphylococcus aureus* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных от людей, было напрямую связано со временем, проведенным ими на животноводческих фермах [33].

Распространению и обмену между животными комменсальных и патогенных бактерий, которые могут содержать АРГ, способствуют такие современные методы ведения сельского хозяйства, как создание крупных стад мясных животных и молочного скота, содержащихся в замкнутых пространствах [46, 53, 57, 58]. Повторное использование подстилки, загрязненной бактериями, содержащими АРГ, также может привести к их распространению от больных животных к здоровым [59, 60].

Ключевым фактором в потоке АРГ между животными, людьми и наземной и водной средой является использование твердого и жидкого навоза в сельском хозяйстве, например в растениеводстве [61, 62]. По оценкам, проведенным в работе [63], до 58% использованных в животноводстве АБ, большая часть из которых попадает в почву, переносятся в окружающую среду [63].

Распространение АРГ животноводческих предприятий со сточными водами, потоками воды и воздуха. Стоки животноводческих производств (сточные воды, навозная жижа предприятий по производству молочных продуктов и мяса) являются источником поступления АРГ и АРБ в окружающую среду. Нойес с соавт. [64] использовали метагеномный подход, чтобы охарактеризовать резистом сточных вод молочных и мясных ферм крупного рогатого скота Северной Америки. Образцы для исследования были отобраны на ранчо, откормочных площадках и молочных заводах. В общей сложности на наличие АРГ были проанализированы 34 образца. Большинство обнаруженных в образцах последовательностей АРГ определяли устойчивость к тетрациклину. Так, в 27 образцах из 30, которые содержали АРГ, присутствовал ген *tetQ*, а в 22 – последовательность *tetW*. Было показано также, что образцы с ранчо содержали наименьшее количество АРГ по сравнению с теми, которые были отобраны с откормочных площадок и молочных предприятий.

В работе [65], проведенной с целью изучения структуры резистома микробных сообществ, были изучены эффекты долгосрочного применения куриного помета и осадка сточных вод в качестве удобрений. Всего в образцах почв было обнаружено 130 АРГ и пять мобильных генетических элементов. Внесение куриного помета и осадка сточных вод в течение длительного времени привело к увеличению разнообразия и обилия почвенных АРГ. Так, было установлено, что значительно возросло содержание генов резистентности и мобильных элементов генома, и наибольший рост наблюдался для гена *mexF* (в 3845 раз). Обширное обогащение мобилома указывало на то, что АРГ могли распространяться в природных бактериальных сообществах посредством ГПГ.

Ряд работ оценивает распространение АРГ в окрестностях животноводческих предприятий с потоками воздуха, поверхностными и грунтовыми водами. Так, Мак Ичран с соавт. [66] сообщили о более высокой численности АРГ с подветренной стороны откормочных площадок мясного скота. Хонг с соавт. [67] не обнаружили зависимости численности АРГ в грунтовых водах от их уровня в окрестностях свинофермы, однако в другом исследовании [68] отмечено обилие АРГ в

речной воде вблизи свинофермы, по сравнению с отдаленными участками.

Среди исследователей нет однозначной оценки роли рыбоводческих предприятий в распространении генов устойчивости к антибиотикам. В одних работах [69] показана более высокая относительная распространенность генов резистентности к тетрациклину вниз по течению, по сравнению с участками вверх по течению от рыбоводческого хозяйства, в зависимости от сезона отбора проб, в то время как другая группа исследователей [70] не обнаружила явного изменения таких параметров на разных расстояниях от предприятия.

Навоз как резервуар АРГ. Использование твердого и жидкого навоза в хозяйстве является традиционной практикой, однако его долгосрочное влияние на резистентность и микробиом окружающей среды исследовано неполно [61, 71]. Использование навоза как удобрения – это комплексная система управления отходами, которая также имеет дополнительное преимущество в виде возврата питательных веществ в почву [72]. Однако из-за присутствия антибиотиков, используемых в животноводстве, навоз, особенно не подвергшийся обработке, является резервуаром АРГ, содержащихся преимущественно в составе мобильных генетических элементов [29, 73–75]. Применение антибиотиков у животных создает в их кишечнике селективную среду для развития АРБ и мультипликации АРГ, которые затем выделяются с навозом [63, 76]. Таким образом, при внесении в почву, навоз служит прямым источником поступления АРБ и АРГ в окружающую среду. Посредством ГПГ эти гены могут переходить к бактериям окружающей среды и, в конечном итоге, могут встраиваться в геном патогенных бактерий, снижая эффективность антибактериальной терапии [77]. Навоз также может содержать другие поллютанты, включая тяжелые металлы, такие как цинк и медь, которые используются в качестве стимуляторов роста, что может привести к совместной селекции резистентности к металлам и АРГ [78]. Кроме того, после выведения из организма животных с навозом, антибиотики или их метаболиты могут сохранять часть своей антимикробной активности, что может служить селективным фактором для усиления распространения АРГ, уже присутствующих в резистоме окружающей среды [29, 63]. Навоз также может загрязнять поверхностные воды при стоке с сельскохозяйственных земель или при выщелачивании в грунтовые воды [62, 79, 80].

Вопрос о влиянии различных типов навоза на микробиоценозы и резистом почв исследовано недостаточно. При изучении навоза свиней, крупного рогатого скота и птицы получены противоречивые данные о весьма различном воздействии этих типов навоза на почвенный микробиом и присутствующие в нем АРГ [81, 82]. Так, свиной навоз способствует наиболее эффективному распространению генов резистентности в почве, что вызывает наибольшую обеспокоенность. Брукс с соавт. [83] использовали количественную ПЦР для подтверждения наличия и уровней генов, обеспечивающих устойчивость к тетрациклину (*tetA* и *tetB*), метициллину (*mecA*) и эритромицину (*ermF*) в стоках свиного навоза, причем уровни АРГ изменялись от 10^5 до 10^9 геномных копий на 100 мл стоков. Другая группа исследователей [84] также идентифицировала разнообразные и многочисленные АРГ на китайских свинофермах. На этих фермах использовались кормовые и терапевтические АБ, которые включали все основные классы, кроме ванкомицина. ПЦР-анализ подтвердил наличие 149 уникальных генов устойчивости в образцах навоза, в значительно больших количествах по сравнению с контролем, не содержащим антибиотиков, и почвой.

Суи с соавт. [85] зарегистрировали увеличение содержания АРГ до 10^8 на г почвы, повышенное из-за использования свиного навоза, затем уровни генов резистентности быстро снизились вновь. В двух других публикациях [86, 87] сообщается, что повышенные после внесения свиного навоза уровни АРГ снизились до фоновых уровней в течение 2 мес.

Можно предположить, что выживание интродуцированных с навозом бактерий и распространение АРГ в почве может варьировать в зависимости от разнообразных условий (характеристик почв, навоза и других неисследованных факторов). Так, было показано, что применение навоза молочного скота увеличивало содержание таких АРГ, как *tetW*, *tetO* и *sulI*, на срок до 4 мес после внесения [88]. Гош и ЛаПара [89] пришли к выводу, что контролируемое применение должным образом обработанного навоза, содержащего АБ, незначительно усиливало перенос АРГ в природные микробиомы, а неконтролируемое его применение значительно увеличивало количество АРГ и АРБ в почвах.

Предполагается, что кратковременность воздействия внесения навоза на почвенный резистом может быть связана с тем, что содержащиеся в нем бактерии плохо адаптированы к условиям существования в почве [72]. Было установлено, что популяции бактерий, внесенные в результате использования навоза, быстро сокращаются, в то время как аборигенный микробоценоз весьма разнообразен [90]. Вероятно, взаимодействие между аборигенным микробиомом почвы и микробиомом навоза является ограничивающим фактором в отношении распространения АРГ. Чен с соавт. [91] продемонстрировали, что в почве, обработанной γ-излучением, после внесения навоза, наблюдали

более высокое содержание АРГ и более высокое бактериальное разнообразие, чем в обработанной навозом необлученной почве. Этот факт свидетельствует о важной роли, которую играет почвенный микробиом в снижении распространения резистентности и уменьшении закрепления АРБ из навоза в почвенных микробиомах. Устойчивость почвенного микробиоценоза к бактериям, поступающим с навозом, приводит к тому, что местный микробиом возвращается в состояние, близкое первоначальному через 1–2 мес [75, 92]. Приведенные данные свидетельствуют о кратковременном воздействии однократного или непродолжительного внесения навоза на почвенное микробное сообщество.

Необходимо, однако, отметить, что влияние продолжительного внесения навоза в почву на почвенный микробиом исследовано плохо. Динг с соавт. [71] показал, что многократное внесение навоза, содержащего сульфадиазин, обогащало почву такими патогенами, как *Clostridium* spp. и *Stenotrophomonas* spp., и в то же время снижало содержание представителей аборигенных таксонов, которые являются необходимыми для поддержания здоровья почвы.

Группа исследователей из Нидерландов [93] предоставила доказательства значительного увеличения численности АРГ в коллекционных образцах за период с 1940 по 2008 гг. Образцы отбирались из почв, в которые регулярно вносили навоз. Исследователи особо выделяют тот факт, что наиболее сильный рост количества генов резистентности был отмечен с 1970 г. до конца времени исследования.

Таким образом, воздействие многократного, регулярного внесения различных типов навоза на резистом окружающей среды и микробиом почв требует пристального внимания исследователей. Предстоит еще также изучить влияние типа почвы и множество других факторов окружающей среды на распространение и накопление АРГ, которые до настоящего времени не были должным образом исследованы.

Влияние обработки и хранения навоза на численность и разнообразие АРГ. Правильная обработка и хранение навоза перед внесением в почву крайне важны для управления рисками переноса АРГ и патогенных микроорганизмов из навоза в микробиом сельскохозяйственных земель и возможного дальнейшего распространения в источники водоснабжения [94]. Было исследовано множество вариантов обработки для уменьшения количества АРГ в навозе. Установлено, что биологическая обработка навоза, такая как анаэробное сбраживание, компостирование, аэрация и добавление извести, а также определенные условия хранения (в бункере или в лагуне), уменьшают разнообразие и численность АРБ и АРГ в навозе [72, 95–97].

Было установлено [98], что компостирование убирает в курином помете больше АРГ, чем в бычьем и свином навозе, хотя первоначально куриный помет и свиной навоз имели наибольшее содержание генов резистентности. Это подчеркивает необходимость более глубокого понимания процесса компостирования и того, как необходимо учитывать различия в типах навоза и времени компостирования, чтобы минимизировать риск распространения АРБ в почвенных микробиомах.

Многие фермы в зимние месяцы не утилизируют произведенный навоз, а хранят его до использования в качестве удобрения в лагунах или кучах [99, 100]. Влиянию хранения на резистом и микробиом навоза также был посвящен ряд исследований [101, 102].

Интересным эффектом применения навоза животных, которых не обрабатывали АБ, может быть размножение почвенных АРБ и увеличение их количества после внесение навоза [61]. Авторы приходят к выводу, что навоз может вызывать увеличение количества АРГ, происходящих не из микробиома навоза, а из микробиома почвы. Это может быть связано с питательными веществами из навоза, усиливающими рост представителей некоторых таксонов, или стимуляцию перекрестной резистентности, либо ко-селекцию другими антропогенными загрязнителями, такими как тяжелые металлы или биоциды [103–105].

Продукты питания. Известно, что в продуктах, традиционно потребляемых в сыром виде, содержится значительное количество АРБ [106, 107]. Происхождение этих АРБ может быть связано с использованием антибиотиков в производстве, что приводит к появлению в них резистентных пищевых патогенов. Источниками АРБ могут быть мясо, птица и листовая зелень [108]. Чаецка-Виерзчовска с соавт. [109] обнаружили устойчивые к стрептомицину, эритромицину, фосфомицину, рифампицину, тетрациклину и тигециклину штаммы энтерококка в готовых к употреблению мясных продуктах. Из мясных и молочных продуктов, приобретенных в торговой сети московского региона, были выделены штаммы энтерококков и энтеробактерий, резистентные к тетрациклину, доксициклину и ампициллину [110]. Количество резистентных к различным антибиотикам изолятов из мясных продуктов колебалось в пределах 38%–54%, из молочных – 21%–33%.

Наиболее вероятными последствиями применения кормовых и ростовых антибиотиков в животноводстве является употребление человеком в пищу мясных продуктов, содержащих непатогенные АРБ. Определенный риск может представлять внесение в почву АРБ с навозом, однако приобретение человеческим микробиомом АРГ

при употреблении растительной пищи представляется менее вероятным, по сравнению с продуктами животного происхождения. Кроме навоза, источниками резистентных бактерий на овощах также могут быть загрязненная вода и почвенные микробиоценозы [111].

Исследования распространения АРБ и АРГ на овощах, удобряемых навозом, показывают противоречивые результаты. Многочисленные АРГ были обнаружены на овощах, выращенных как на удобряемых навозом почвах, так и на почвах без навоза [106]. Авторы предложили компостировать навоз для снижения негативного воздействия генетических детерминант резистентности.

Поливная вода также является источником загрязнения АРБ в растениеводстве [29]. Группа бельгийских исследователей [107] обнаружила резистентные изоляты *E. coli* в поливной воде и на салате. Наиболее загрязненными АРГ образцами были растения салата. Профили резистентности взятых образцов были наиболее близки к профилям изолятов, полученных от крупного рогатого скота, который, по всей вероятности, и был источником загрязнения.

Было показано, что и собственно сельскохозяйственные культуры, удобренные навозом, могут быть резервуаром АРБ [106, 112]. Антибиотики могут быть перенесены внутрь растений путем транспортировки воды через ксилемные ткани, а также путем пассивной абсорбции [29, 112]. Поскольку овощи обычно едят сырыми, это приводит к проникновению АРБ из овощей в кишечник человека. В кишечнике АРГ из бактерий окружающей среды способны интегрироваться в патогены микробиома человека и, соответственно, снижать терапевтический эффект антибиотиков [106, 113].

В целом, необходимо отметить, что продукты питания, особенно употребляемые в сыром виде, могут привести к проникновению в организм человека АРБ, а также к интеграции АРГ из этих бактерий в микробиом кишечника.

Практически все страны в большей или меньшей степени пытаются законодательно регулировать содержание АБ в пищевых продуктах. В общемировом масштабе главным документом, регламентирующим остаточные количества антибиотиков в продукции животноводства и растениеводства, является Кодекс Алиментариус (http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/ru/), разработанный и постоянно обновляемый ФАО и ВОЗ в течение нескольких десятилетий. Для Российской Федерации основным документом, определяющим остаточные количества АБ в продукции животноводства, является “Технический регламент Таможенного союза “О безопасности мяса и мясной продукции” (https://rostest.net/wp-content/uploads/2014/10/TR-TS-034-2013-O-bezopasnosti-myasa-i-myasnoi-produktsii.pdf). В качестве методов контроля остаточных количеств АБ применяют преимущественно иммуноферментный анализ и высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрической детекцией. Кроме того, используют микробиологические и биосенсорные методы, основанные на хемилюминесцентных биочипах. Десятки Методик выполнения измерений (МВИ), Методик измерений (МИ) и ГОСТов, описывающих количественные методы контроля АБ, приведены в приложении к Техническому регламенту (http://docs.cntd.ru/document/563817500). Тем не менее, избежать присутствия АРБ и АРГ в пищевых продуктах удается далеко не всегда.

Устойчивость к антибиотикам является одной из самых больших угроз для здравоохранения во всем мире. Проблема накопления, распространения и эволюции устойчивых к антибиотикам бактерий и генов резистентности, в связи с применением антибиотиков в животноводстве, – это сложный, многофакторный и недостаточно полно исследованный вопрос, который еще крайне далек от полного понимания. Как было продемонстрировано в данном обзоре, существует ряд научных исследований, доказывающих существование тесных связей между микробиомами сельскохозяйственных животных, человека, агроценозов и окружающей среды с точки зрения использования антибиотиков и распространения устойчивости к антибиотикам. Хотя существование таких связей никто не подвергает сомнению, конкретные механизмы и степень влияния на здравоохранение и устойчивость окружающей среды требуют тщательного изучения.

Из затронутых тем, наиболее изученной является поступление АРГ в окружающую среду с отходами животноводства, но даже в этом случае существует множество противоречивых данных, и судьба генов резистентности в природных микробных сообществах в значительной степени неясна. Гораздо менее исследованными, хотя и крайне важными с точки зрения здравоохранения, остаются вопросы распространения генетических детерминант лекарственной устойчивости в популяциях сельскохозяйственных животных и взаимный обмен таким материалом между животными и обслуживающим персоналом. Слабо исследовано влияние применения антибиотиков в аквакультуре на распространение АРГ в окружающей среде. Крайне пристального внимания, в связи с практической важностью, требует проблема поступления АРГ в микробиом человека при употреблении пищевых продуктов как животного, так и растительного происхождения.

Использование клинически важных антибиотиков в сельском хозяйстве является одним из

факторов, влияющих на устойчивость бактерий к антибиотикам. Без дальнейших исследований механизмов, связывающих распространение и поддержание АРГ в популяциях человека, животных и окружающей среде, человечество может оказаться в критической ситуации, аналогичной эпохе, предшествующей использованию антибиотиков, когда легко излечимые в настоящее время бактериальные инфекции приводили к летальному исходу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0852-2020-0029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *van Hoek A.H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J.M.* // Front. Microbiol. 2011. V. 2. 203. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203
2. *Michael C.A., Dominey-Howes D., Labbate M.* // Front. Public Health. 2014. V. 2. 145. https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145
3. *Rossolini G.M., Arena F., Pecile P., Pollini S.* // Curr. Opin. Pharmacol. 2014. V. 18. P. 56–60. https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006
4. *Walsh F., Duffy B.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. e65567.
5. *Pepper I.L.* // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2013. V. 43. № 24. P. 2617–2652. https://doi.org/10.1080/10643389.2012.694330
6. *Adu-Oppong B., Gasparrini A.J., Dantas G.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2017. V. 1388. № 1. P. 42–58. https://doi.org/10.1111/nyas.13257
7. *Hu Y., Yang X., Li J., Lv N., Liu F., Wu J., Lin I.Y., Wu N., Weimer B.C., Gao G.F., Liu Y., Zhu B.* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. № 22. P. 6672-6681. https://doi.org/10.1128/AEM.01802-16
8. *Hsu C., Hsu B., Ji W., Chen J., Hsu T., Ji D., Tseng S., Chiu Y., Kao P., Huang Y.* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. № 10. P. 7843–7850.
9. *Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K.H.* // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. № 23. P. 7445–7450.
10. *Brooks J.P., McLaughlin M.R., Gerba C.P., Pepper I.L.* // J. Environ. Qual. 2012. V. 41. № 6. P. 2009–2023.
11. *Sazykin I.S., Seliverstova E.Yu., Khmelevtsova L.E., Azhogina T.N., Kudeevskaya E.M., Khammami M.I., Gnennaya N.V., Al-Rammahi A.A.K., Rakin A.V, Sazykina M.A.* // Theoretical and Applied Ecology. 2019. V. 4. P. 76–82. https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-076-082
12. *Manaia C.M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovides I.C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I., Nunes O.C.* Environ Int. 2018. V. 115. P. 312–324. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044
13. *Berendonk T.U., Manaia C.M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., Burgmann H., Sorum H., Norstrom M., Pons M., Kreuzinger N., Huovinen P., Stefani S., Schwartz T., Kisand V., Baquero F., Martinez J.L.* // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 13. № 5. P. 310–317.
14. *Gillings M.R., Gaze W.H., Pruden A., Smalla K., Tiedje J.M., Zhu Y.* // ISME J. 2015. V. 9. № 6. P. 1269–1279.
15. *Martinez J.L.* // Science. 2008. V. 321. № 5887. P. 365–367.
16. *Storteboom H., Arabi M., Davis J.G., Crimi B., Pruden A.* // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. № 6. P. 1947–1953.
17. *Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B., Farrar J.* // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2015. V. 370. № 1670. 20140083. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083
18. *Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A.* // Pathog. Glob. Health. 2015. V. 109. № 7. P. 309–318.
19. *Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., Laxminarayan R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. V. 112. № 18. P. 5649–5654.
20. *Aarestrup F.M.* // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2015. V. 370. № 1670. 20140083. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0085
21. *Union of Concerned Scientists*. Hogging it: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock. Cambridge. MA: UCS Publ, 2001. 109 p.
22. *Ying G.G., He L.Y., Ying A.J., Zhang Q.Q., Liu Y.S., Zhao J.L.* // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. № 3. P. 1072–1073.
23. *Zhang Q.Q., Ying, G.G., Pan C.G., Liu Y.S., Zhao J.L.* // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 49. № 11. P. 6772–6782.
24. *Van T.T.H., Yidana Z., Smooker P.M., Coloe P.J.* // J. Glob. Antimicrob. Resist. 2020. V. 20. P. 170–177. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.031
25. Techart – Публикации: обзоры, статьи, доклады, комментарии – Антибиотики и корма https://research.techart.ru/publication/556.htm (дата обращения 01.07.2020)
26. *MacDonald J.M., McBride W.D.* The Transformation of U.S. Livestock Agriculture: Scale, Efficiency and Risks. United States: Depart. Agriculture, 2009. 40 p.
27. *Founou L.L., Founou R.C., Essack S.Y.* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. 1881. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881
28. *Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W.P.* // Evol. Appl. 2015. V. 8. № 3. P. 240–247.
29. *Thanner S., Drissner D., Walsh F.* // mBio. 2016. V. 7. e02227-15. https://doi.org/10.1128/mBio.02227-15
30. *Callens B., Persoons D., Maes D., Laanen M., Postma M., Boyen F., Haesebrouck F., Butaye P., Catry B., Dewulf J.* // Prev.Vet. Med. 2012. V. 106. № 1. P. 53–62.
31. *Aarestrup F.M.* // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2005. V. 96. № 4. P. 271–281.
32. *Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R.* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2001. V. 17. № 6. P. 431-437. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00297-7

33. *Thakur S.D., Panda A.K.* // Curr. Sci. 2017. V. 113. № 10. P. 1846–1857. https://doi.org/10.18520/cs/v113/i10/1846-1857
34. *Argudín M.A., Deplano A., Meghraoui A., Dodémont M., Heinrichs A., Denis O., Nonhoff C., Roisin S.* // Antibiotics (Basel). 2017. V. 6. № 2. 12. https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012
35. *Viswanathan V.K.* // Gut Microbes. 2014. V. 5. № 1. P. 3–4.
36. *Sekyere J.O., Asante J.* // Microbiology. 2018. V. 13. № 2. P. 241–262. https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0172
37. *Roberts M.C.* // FEMS Microbiol. Rev. 1996. V. 9. № 1. P. 1–24.
38. *Davies J.* // Science. 1994. V. 264. № 5157. P. 375–382. https://doi.org/10.1126/science.8153624
39. *Everett M.J., Piddock L.J.V.* Quinolone Antibacterials. / Eds. J. Kuhlmann, A. Dalhoff, H.-J. Zeiler: Heidelberg, Berlin: Springer Verlag, 1998. P. 259–296.
40. *Wi Y.M., Greenwood-Quaintance K.E., Brinkman C.L., Lee J.Y.H., Howden B.P., Patel R.* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2018. V. 51. № 5. P. 670–677. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.12.019
41. *Schwarz S., Noble W.C.* // Vet. Dermatol. 1999. V. 10. № 3. P. 163–176.
42. *MacGowan A., Macnaughton E.* // Medicine. 2017. V. 45. № 10. P. 622–628. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006
43. *Osborn A.M., Böltner D.* // Plasmid. 2002. V. 48. № 3. P. 202–212.
44. *Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brussow H.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. № 2. P. 238–276.
45. *Muloi D., Ward M.J., Pedersen A.B., Fèvre E.M., Woolhouse M.E.J., van Bunnik B.A.D.* // Foodborne Pathog. Dis. 2018. V. 15. № 8. P. 467–474.
46. *Dierikx C.M., van der Goot J.A., Smith H.E., Kant A., Mevius D.J.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. e79005. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079005
47. *Higuera-Llantén S., Vásquez-Ponce F., Barrientos-Espinoza B., Mardones F.O., Marshall S.H., Olivares-Pacheco J.* // PLoS ONE. 2018. V. 13. e0203641.
48. *Webb H.E., Bugarel M., den Bakker H.C., Nightingale K.K., Granier S.A., Scott H.M., Loneragan G.H.* // PLoS ONE. 2016. V. 11. e0147363.
49. *Birkegård A.C., Halasa T., Græsbøll K., Clasen J., Folkesson A., Toft N.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. 9683. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10092-9
50. *Thung T.Y., Mahyudin N.A., Basri D.F., Wan Mohamed Radzi C.W.J., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Radu S.* // Poult. Sci. 2016. V. 95. № 8. P. 1888–1893.
51. *Moawad A.A., Hotzel H., Awad O., Tomaso H., Neubauer H., Hafez H.M., El-Adawy H.* // Gut Pathog. 2017. V. 9. 57. https://doi.org/10.1186/s13099-017-0206-9
52. *Донник И.М., Исаева А.Г., Быкова О.А., Лысова Я.Ю., Моисеева К.В., Кривоногова А.С.* // Ветеринария Кубани. 2019. № 1. С. 7–10.
53. *Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L.* // Public Health Rep. 2012. V. 127. № 1. P. 4–22. https://doi.org/10.1177/003335491212700103
54. *Castillo Neyra R., Vegosen L., Davis M.F., Price L., Silbergeld E.K.* // Saf. Health Work. 2012. V. 3. № 2. P. 85–91.
55. *Hammerum A.M., Larsen J., Andersen V.D., Lester C.H., Skovgaard Skytte T.S., Hansen F., Olsen S.S., Mordhorst H., Skov R.L., Aarestrup F.M., Agersø Y.* // J. Antimicrob. Chemother. 2014. V. 69. № 10. P. 2650–2657.
56. *Dohmen W., Bonten M.J.M., Bos M.E.H., van Marm S., Scharringa J., Wagenaar J.A., Heederik D.J.* // Clin. Microbiol. Infect. 2015. V. 21. № 10. P. 917–923.
57. *Kyselková M., Jirout J., Vrchotová N., Schmitt H., Elhottová D.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. 536. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00536
58. *Brower C.H., Mandal S., Hayer S., Sran M., Zehra A., Patel S.J., Kaur R., Chatterjee L., Mishra S., Das B.R., Singh P., Singh R., Gill J.P.S., Laxminarayan R.* // Environ. Health Perspect. 2017. V. 125. № 7. 077015. https://doi.org/10.1289/EHP292
59. *Singer A.C., Shaw H., Rhodes V., Hart A.* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. 1728. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728
60. *Liu J., Zhao Z., Orfe L., Subbiah M., Call D.R.* // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. № 2. P. 557–564.
61. *Udikovic-Kolic N., Wichmann F., Broderick N.A., Handelsman J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. V. 111. № 42. P. 15202–15207.
62. *Kivits T., Broers H.P., Beeltje H., van Vliet M., Griffioen J.* // Environ. Pollut. 2018. V. 241. P. 988–998. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.085
63. *Xie W.Y., Shen Q., Zhao F.J.* // Eur. J. Soil Sci. 2018. V. 69. № 1. P. 181–195. https://doi.org/10.1111/ejss.12494
64. *Noyes N.R., Yang X., Linke L.M., Magnuson R.J., Cook S.R., Zaheer R., Yang H., Woerner D.R., Geornaras I., McArt J.A., Gow S.P., Ruiz J., Jones K.L., Boucher C.A., McAllister T.A., Belk K.E., Morley P.S.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. 24645. https://doi.org/10.1038/srep24645
65. *Chen Q., An X., Li H., Su J., Ma Y., Zhu Y.G.* // Environ. Int. 2016. V. 92–93. P. 1–10. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026
66. *McEachran A.D., Blackwell B.R., Hanson J.D., Wooten K.J., Mayer G.D., Cox S.B., Smith P.N.* // Environ. Health Perspect. 2015. V. 123. № 4. P. 337–343.
67. *Hong P.Y., Yannarell A.C., Dai Q., Ekizoglu M., Mackie R.I.* // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 8. P. 2620–2629.
68. *Jia S., He X., Bu Y., Shi P., Miao Y., Zhou H., Shan Z., Zhang X.X.* // J. Environ. Sci. Health. 2014. V. 49. № 8. P. 624–631.
69. *Harnisz M., Korzeniewska E., Gołaś I.* // Chemosphere. 2015. V. 128. P. 134–141. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.035
70. *Tamminen M., Karkman A., Lohmus A., Muziasari W.I., Takasu H., Wada S., Suzuki S., Virta M.* // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. № 2. P. 386–391.

71. *Ding G.C., Radl V., Schloter-Hai B., Jechalke S., Heuer H., Smalla K., Schloter M.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. e92958. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092958

72. *Muurinen J., Stedtfeld R., Karkman A., Pärnänen K., Tiedje J., Virta M.* // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. № 11. P. 5989–5999.

73. *Jechalke S., Kopmann C., Rosendahl I., Groeneweg J., Weichelt V., Krögerrecklenfort E., Brandes N., Nordwig M., Ding G.C., Siemens J., Heuer H., Smalla K.* // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 5. P. 1704–1711.

74. *Binh C.T.T., Heuer H., Kaupenjohann M., Smalla K.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 66. № 1. P. 25–37.

75. *Gou M., Hu H.W., Zhang Y.J., Wang J.T., Hayden H., Tang Y.Q., He J.Z.* // Sci. Total Environ. 2018. V. 612. P. 1300–1310. doi.org/ https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.028

76. *Looft T., Johnson T.A., Allen H.K., Bayles D.O., Alt D.P., Stedtfeld R.D., Chai B., Cole J.R., Hashsham S.A., Tiedje J.M., Stanton T.B.* // Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 2012. V. 109. № 5. P. 1691–1696.

77. *Lin H., Zhang J., Chen H., Wang J., Sun W., Zhang X., Yang Y., Wang Q., Ma J.* // Sci. Total Environ. 2017. V. 607–608. P. 725–732. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.057

78. *Yazdankhah S., Rudi K., Bernhoft A.* // Microb. Ecol. Health Dis. 2014. V. 25. № 1. https://doi.org/10.3402/mehd.v25.25862

79. *Manyi-Loh C.E., Mamphweli S.N., Meyer E.L., Makaka G., Simon M., Okoh, A.I.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2016. V. 13. № 9. 843. https://doi.org/10.3390/ijerph13090843

80. *Hill D.D., Owens W.E., Tchoounwou P.B.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2005. V. 2. № 2. P. 314–321.

81. *Zhang Y.J., Hu H.W., Gou M., Wang J.T., Chen D., He J.Z.* // Environ. Pollut. 2017. V. 231. Pt. 2. P. 1621–1632. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.074

82. *Han X.M., Hu H.W., Chen Q.L., Yang L.Y., Li H.L., Zhu Y.G.* // Soil Biol. Biochem. 2018. V. 126. P. 91–102. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.018

83. *Brooks J.P., Adeli A., McLaughlin M.R.* // Water Res. 2014. V. 57. P. 96–103. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.017

84. *Zhu Y.G., Johnson T.A., Su J.Q., Qiao M., Guo G.X., Stedfeld R.D., Hasham S.A., Tiedge J.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 2013. V. 110. № 9. P. 3435–3440.

85. *Sui Q., Zhang J., Chen M., Tong J., Wang R., Wei Y.* // Environ. Pollut. 2016. V. 213. P. 751–759. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.038

86. *Heuer H., Smalla K.* // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. № 3. P. 657–666. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x

87. *Fahrenfeld K., Knowlton K., Krometis L.A., Hession W.C., Xia K., Lipscomb E., Libuit K., Green B.L., Pruden A.* // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. № 5. P. 2643–2650.

88. *Munir M., Wong K., Xagoraraki I.* // Water Res. 2011. V. 45. № 2. P. 681–693. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033

89. *Ghosh S., LaPara T.M.* // ISME J. 2007. V. 1. № 3. P. 191–203. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.31

90. *Moynihan E.L., Richards K.G., Brennan F.P., Tyrrel S.F., Ritz K.* // Appl. Soil Ecol. 2015. V. 89. P. 76–84. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.01.011

91. *Chen Q.L., An X.L., Li H., Zhu Y.G., Su J.Q., Cui L.* // Soil Biol. Biochem. 2017. V. 114. P. 229–237. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.07.022

92. *Leclercq S.O., Wang C., Sui Z., Wu H., Zhu B., Deng Y., Feng J.* // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. № 10. P. 3494–3508.

93. *Knapp C.W., Dolfing J., Ehlert P.A.I., Graham D.W.* // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. № 2. P. 580–587.

94. *FSAI.* Food Safety Implications of Land-Spreading Agricultural, Municipal and Industrial Organic Materials on Agricultural Land Used for Food Production in Ireland. Dublin: Food Safety Authority of Ireland, 2008. 180 p.

95. *Pruden A., Larsson D.G.J., Amézquita A., Collignon P., Brandt K.K., Graham D.W., Lazorchak J.M., Suzuki S., Silley P., Snape J.R., Topp E., Zhang T., Zhu Y.G.* // Environ. Health Persect. 2013. V. 121. № 8. P. 878–885.

96. *Sun W., Qian X., Gu J., Wang X.J., Duan M.L.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. 30237. https://doi.org/10.1038/srep30237

97. *Burch T.R., Sadowsky M.J., LaPara T.M.* // Front. Microbiol. 2013. V. 4. 17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00017

98. *Qian X., Gu J., Sun W., Wang X.J., Su J.Q., Stedfeld R.* // J. Hazard. Mater. 2018. V. 344. P. 716–722. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.020

99. *Pornsukarom S., Thakur S.* // PLoS ONE. 2016. V. 11. e0164621. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164621

100. *McGarvey J.A., Miller W.G., Zhang R., Ma Y., Mitloehner F.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 1. P. 193–202.

101. *Duriez P., Topp E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 17. P. 5486–5493.

102. *Joy S.R., Li X., Snow D.D., Gilley J.E., Woodbury B., Bartelt-Hunt S.L.* // Sci. Total Environ. 2014. V. 481. P. 69–74. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.027

103. *Pal C., Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.G.J.* // BMC Genomics. 2015. V. 16. 964. https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5

104. *Sun W., Qian X., Gu J., Wang X.J., Zhang L., Guo, A.Y.* // Bioresour. Technol. 2017. V. 234. P. 217–223. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.025

105. *Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V.* // Trends Microbiol. 2006. V. 14. № 4. P. 176–182.

106. *Marti R., Scott A., Tien Y.C., Murray R., Sabourin L., Zhang Y., Topp E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2013.

V. 79. № 18. P. 5701–5709.
https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13

107. *Holvoet K., Sampers I., Callens B., Dewulf J., Uyttendaelw M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 21. P. 6677–6683.
https://doi.org/10.1128/AEM.01995-13

108. *Friedman M.* // J. Agric. Food Chem. 2015. V. 63. № 15. P. 3805–3822.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00778

109. *Chajecka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Laniewoka-Trokenheim K.* // J. Food Sci. 2016. V. 81. № 11. P. M2799–M2807.
https://doi.org/10.1111/1750-3841.13523

110. *Короткевич Ю.В.* // Вопросы питания. 2016. № 2. С. 5–13.

111. *Oliveira M., Vinas L., Usall J., Anguera M., Abadias M.* // Int. J. Food Microbiol. 2012. V. 156. № 2. P. 133–140.

112. *Hu X., Zhou Q., Luo Y.* // Environ. Pollut. 2010. V. 158. № 9. P. 2992–2998.

113. *van Schaik W.* // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2015. V. 370. № 1670. 20140087.
https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0087

Influence of Antibiotics Use in Animal Breeding on Dissemination of Bacterial Drug Resistance

I. S. Sazykin[a], L. E. Khmelevtsova[a], E. Yu. Seliverstova[a], and M. A. Sazykina[a, *]

[a] *Southern Federal University, Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Rostov-on-Don, 344090 Russia*
**e-mail: samara@sfedu.ru*

Currently antibiotics (AB) are extremely widely used in animal breeding. Due to the abuse of AB, they become the reason of rapid distribution of antibiotic resistance genes (ARG) and bacteria (ARB) in microbial communities of the environment. In this review the works devoted to use of AB in animal breeding, transfer of ARG and ARB from animals to people and to their distribution in the environment with wastewaters of the animal breeding farms, water and air flows and are considered. The role of manure as ARG reservoir, the impact of processing and storage of manure on the number and variety of ARB and ARG are also analysed. In the final part the questions connected with presence of ARG and ARB in livestock and crop produce and their introduction into people microbiome with food are raised.

Keywords: antibiotic resistance genes, ARG, antibiotic resistant bacteria, ARB, breeding, manure, soil resistome

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 36–45

УДК 57.012.5

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПЕКТИНА НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ЛИЗОЦИМОМ

© 2021 г. Ю. А. Антонов[1], *, И. Л. Журавлёва[1]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

*e-mail: chehonter@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.06.2020 г.
После доработки 31.08.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Методами динамического светорассеяния, турбидиметрии, оптической микроскопии высокого разрешения, измерения электрофоретической подвижности изучено взаимодействие лизоцима (**ЛИЗ**) с пектинами, различающимися суммарными или локальными зарядами (с блочным и статистическим распределением метоксильных групп БП и СП). СП 16.2, 38.2, и БП 16.9, 33.1 образуют при pH 5.1, ионной силе $I = 0.01$, и $q < q_{max}$ водорастворимые комплексы в диапазоне составов смесей от $q \cong 7 \times 10^{-4}$ до $q = 3.0 \times 10^{-3}$, где q-соотношение весовых концентраций пектин : ЛИЗ, и водонерастворимые комплексы при q выше 3×10^{-3}. Для СП 66.5 и БП 68.2 соответствующие показатели были выше, и составляли от $q \cong 3 \times 10^{-3}$ до $q \cong 0.01$, и q выше 0.01. Комплексы ЛИЗ с БП имели большие размеры (15–20 мкм) при всех изученных степенях метоксилирования (**СМ**), в то время как средние размеры комплексов с СП существенно меньше (от 0.6 до 3 мкм) и зависели от СМ. Комплексы на основе БП имели гелеобразную морфологию независимо от СМ, тогда как частицы комплекса с СП были как в виде коацерватных капель, так и в виде гелеобразных частиц в зависимости от СМ. Критическое значение ионной силы I_{set}, выше которого комплексы ЛИЗ с СП и БП не образовывались, составляло 0.11. При этом значения I_{set} и pH_{set} для систем БП/ЛИЗ не зависело от СМ пектина, для систем СП/ЛИЗ они уменьшались значительно с ростом СМ. Зависимость комплексообразования ЛИЗ с пектином от I носило немонотонный характер с максимумом при I равным 0.03 для СП и 0.06 для БП. Понимание влияния суммарного заряда молекул пектина и его распределения вдоль цепи на его комплексообразование с белком является важным для предсказания стабильности структуры пищевых продуктов.

Ключевые слова: пектин, лизоцим, комплексообразование, суммарный заряд, локальный заряд, структура

DOI: 10.31857/S0555109921010190

Пектины и их смеси с другими биополимерами находят широкое применение в фармацевтике, биотехнологии и пищевой индустрии [1]. Являясь полиэлектролитами, они могут взаимодействовать в водных растворах с белками с образованием комплексов белок-пектин [2–4] или подвергаться фазовому разделению концентрированием белка и пектина в разных фазах [5–8]. Термодинамическая совместимость пектина с белками (желатина и рубиско) увеличивается с возрастанием степени метоксилирования (**СМ**) и локальной плотности заряда пектина [9, 10]. Использование пектина с высокой СМ в качестве флокулянта для таких природных биологических жидкостей, как обезжиренное молоко, молочная сыворотка и клеточный сок листьев зеленых растений, позволяет фракционировать белки молока и зеленых листьев [8], а также получать жидкие концентраты мицелярного казеина [7]. Оказалось, что взаимодействие пектина с белками влияет на фазовое поведение, стабильность и структуру пищевых систем. В связи с этим в последние 20 лет интенсивно исследуется комплексообразование пектинов с белками [11–15]. В частности было установлено, что агрегация этих комплексов, не растворимых в воде, максимальна в условиях стехиометрии зарядов, равной 1, которая соответствует их нейтрализации [12]. В некоторых системах не электростатические взаимодействия пектин/белок усиливают связывание биополимеров в комплекс [16]. В случае пектинов с низкой СМ образующиеся водородные межмолекулярные связи вносят определенный вклад в образование комплексных коацерватов [11]. Гидрофобные взаимодействия между цепями пектина, как правило, незначительны вследствие гидрофильного характера молекулы пектина [11].

Лизоцим (**ЛИЗ**) относится к хорошо изученным малым глобулярным основным белкам (с молекулярной массой 14.3 kDa) и обладает положительным зарядом в растворах с pH ≤ 10.5. Анализ поверхности его молекулы показал отсутствие на ней областей специфического связывания с полисахаридами [17]. Поскольку системы пектин/ЛИЗ применяются в пищевой промышленности, то изучение образования таких комплексов становится весьма актуальным.

Цель работы – изучение комплексообразования ЛИЗ с пектинами, различающимися суммарными или локальными зарядами, но имеющими близкие молекулярные массы.

МЕТОДИКА

Препараты и приготовление растворов. Лизоцим куриного белка (диализованный и лиофилизованный, "Sigma-Aldrich", США) использован без дополнительной очистки. В работе использовали пектин с молекулярной массой 56.1 kDa и СМ 95.1% ("Sigma-Aldrich", Бельгия). Пектины со статистическим распределением метоксильных групп (**СП**) и разной СМ: 16.2% (СП 16.2), 38.2% (СП 38.2), 66.5% (СП 66.5) и 77.7% (СП 77.7), получены химической модификацией из цитрусового пектина (СМ95.1%) путем титрования 0.1 М NaOH при 4°C до pH 11, как описано ранее [18]. Пектины с блочным распределением метоксильных групп (БП) и разной СМ: 16.9% (БП 16.9), 33.1% (БП 33.1) и 68.2% (БП 68.2), получены энзиматически с применением метилэстеразы. Энзиматическая деэтерификация включала инкубацию пектина (СМ 95.1%) с метилэстеразой при 30°C. Детальная процедура получения СП и БП пектинов описана ранее [18]. Их конечные растворы были оттитрованы до pH 6.0, диализованы(Spectra/Por®, MWCO = 12–14 kDa) против деминерализованной воды в течение 48 ч и высушены лиофильно. Полученные пектины каждой партии были охарактеризованы на содержание СМ, используя ИК-Фурье спектроскопии (**FT-IR,** "Shimadzu FTIR-8400S", Япония), как описано ранее [18]. Профиль молекулярно-массового распределения, полученный с помощью эксклюзионной хроматографии, не выявил наличия деполимеризации. Полученная средняя величина молекулярной массы всех образцов пектина была 44.6 ± 3.5 kDa [18]. Во всех экспериментах использовался способ очистки воды на установке Milli-Q. Для получения растворов ЛИЗ и пектина с требуемыми концентрациями навеску биополимеров постепенно добавляли в буфер на основе 0.0079 М уксусной кислоты и 0.1 М NaOH (pH 5.1 и ионная сила $I = 0.01$) при 23°C и перемешивали в течение 1 ч. Для удаления не растворившихся частиц растворы центрифугировали при 50000 g в течение 1 ч при 23°C. Концентрацию ЛИЗ определяли по оптическому поглощению растворов, используя коэффициент экстинкции при 281.5 нм, равный 2.64 мл мг$^{-1}$ см$^{-1}$ [19], а концентрацию пектина – после высушивания раствора до постоянного веса при 104°C. Для получения смесей пектин/ЛИЗ с различным весовым соотношением (q) полимеров расчитанное количество раствора пектина добавляли к раствору ЛИЗ известной концентрации при 23°C. Изучение влияния pH на комплексообразование пектин/ЛИЗ осуществляли в области значений от 5.0 до 11.0, изменяя pH 0.1–0.5 М NaOH, а влияния I на комплексообразование - изменяя его от 0.01 до 0.5 добавлением 3.5 М NaCl.

Измерение дзета (ς) -потенциала. Измерение ς-потенциала пектина, ЛИЗ и комплексов пектин/ЛИЗ при разных значениях q, было проведено в прямоугольных кварцевых кюветах на анализаторе 90 Plus particle ("Brookhaven Instruments Inc.", США) при 23°C. Для каждого образца проводили 10 измерений с последующим определением среднего значения.

Турбидиметрия. Зависимости мутности систем от весового отношения пектин/ЛИЗ (q) получены при 500 нм на спектрометре UV/VIS ("Unico 2800", США). Погрешность измерения составляла 2–3%. В течение роста q определяли точки, характеризующие процесс комплексообразования и определяющие переходы от отсутствия к образованию водорастворимых комплексов (q_{Onset}), от водорастворимых комплексов к водонерастворимым комплексам (q_{ϕ}) и их фазовому разделению, а также точку максимального выхода комплекса ($q_{\max}$) [16].

Динамическое светорассеяние. Функции "интенсивность светорассеяния – распределение по размерам" для ЛИЗ, пектина и смесей пектин/ЛИЗ определяли в прямоугольных кюветах (1 см) на "MalvernZetasizerNano-ZS" ("Malvern", Англия), повторяя измерения семь раз. Растворы ЛИЗ перед измерением очищали, пропуская через фильтры DISMIC-25cs (ацетат целлюлозы) с размером пор 0.22 мкм ("Jonsonscientific", Сингапур). Пектины и их смеси с ЛИЗ использовали без предварительной очистки. Данные по интенсивности светорассеяния обрабатывали по программе, установленной в "Malvern Zetasizer Nano".

Микроскопия. Микроскопические наблюдения проводили на микроскопе "BX51W1 Olympus" ("Olympus", Япония), оборудованном видеокамерой высокого разрешения C-8800-21 (1000 × 1000 пиксель, C-8800-21, "Hamamatsu", Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Величины ς-потенциалов и параметры комплексообразования q_{Onset}, q_{ϕ} и $q_{\max}$. Предварительные

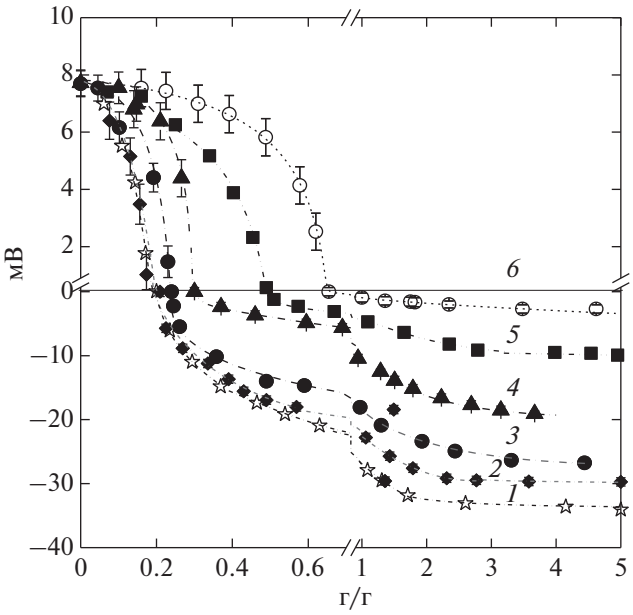

Рис. 1. Зависимости ζ-потенциала от q смесей СП/ЛИЗ при разных значениях СМ, (*1–6*), pH 5.1, I = = 0.01, 23°C. Концентрации биополимеров до смешения – 0.3%; *1* – СП 16.2; *2* – СП 27.8; *3* – СП 38.2; *4* – СП 66.5; *5* – СП 77.7; *6* – СП 95.1

эксперименты показали, что абсолютная величина ς-потенциалов пектинов уменьшались линейно с ростом СМ: от –34.1 мВ для СП 16.2 до – 2.8 мВ для СП 95.1 (данные не представлены). При pH 5.1 ЛИЗ имел положительное значение ς = +7.7 мВ, которое практически совпадало с данными литературы [20]. Поэтому логично было полагать, что при смешивании растворов ЛИЗ и пектина может осуществляться комплексообразование этих биополимеров. Зависимость ς-потенциало в системах СП/ЛИЗ от q для различных значений СМ пектина показана на рис. 1. Положительная величина ς для ЛИЗ быстро падала до нулевого значения с добавлением пектина, и поверхностный заряд образовавшихся комплексов становился отрицательным при дальнейшем увеличении q. Полная нейтрализация заряда ЛИЗ наблюдалась при значениях q, равных 0.21, 0.24, 0.3 или 0.51 для систем с СП 16.2, СП 27.8, СП 38.2, СП 66.5 или СП 77.7 соответственно. Полученные результаты свидетельствовали о том, что электростатические взаимодействия представляли основные движущие силы комплексообразования. Смешивание прозрачных растворов пектина и ЛИЗ приводило к быстрому возникновению мутности, если значение q превышало критическую величину q_{Onset}. Зависимость мутности при 500 нм (τ_{500}) от q для систем СП/ЛИЗ и БП/ЛИЗ представлены на рис. 2а–2в. Предварительные эксперименты показали что системы, содержащие пектин с СМ 95.1%, оставались прозрачными во всем изученном интервале q (от 10^{-4} до 100).

Основываясь на данных турбидиметрии, можно было выделить несколько областей q, характеризующих различные состояния комплексных систем (рис. 2а', 2а", 2б', 2б", 2в', 2в"). Область I характеризовалась отсутствием комплексообразования, а "q_{Onset}" [16] – значение q, начиная с которого образуются растворимые комплексы В области II существовали растворимые комплексы, а точка "q_{ϕ}" [16] свидетельствовала о начале образования нерастворимых комплексов. Область III соответствовала фазовому расслоению нерастворимых комплексов. Следующая область IV характеризовалась наличием растворимых комплексов с точкой "q_{ϕ}^{*}" перехода от нерастворимых комплексов к растворимым. В последней области V комплексообразование отсутствовало, а точка "q_{set}" указывала то значение q, выше которого оно прекращалось.

Поведение смесей напрямую зависело от значений СМ и q и, следовательно, от заряда обоих биополимеров. Зависимости τ_{500} от q носили экстремальный характер с максимумами τ_{500}, наблюдавшимися для систем БП 16.9/ЛИЗ, БП 33.1/ЛИЗ и БП 68.2/ЛИЗ при $q_{\max}$ = 0.208, 0.246 и 0.369 соответственно, и для систем СП 16.2/ЛИЗ, СП 38.2/ЛИЗ и СП 66.5/ЛИЗ при $q_{\max}$ = 0.206, 0.240 и 0.30 соответственно. Принимая во внимание, что средневесовой молекулярный вес ЛИЗ 14.3 кДа [20] и пектина 44.6 кДа, можно было грубо оценить молярное соотношение ЛИЗ/пектин в комплексной фазе систем СП/ЛИЗ при $q_{\max}$. Это соотношение составляло ~18 : 1 моль ЛИЗ/моль пектина для системы СП 16.2/ЛИЗ, 15:1 для системы СП 38.2/ЛИЗ и 12:1 для систем СП 66.5/ЛИЗ соответственно. Величина $q_{\max}$ для системы БП 68.2/ЛИЗ, характеризующая в первом приближении стехиометрический состав, оказалась заметно выше ($q_{\max}$ = 0.37), чем для системы СП 66.5/ЛИЗ ($q_{\max}$ = 0.30). Другими словами в составе первых систем содержалось большее количество пектина. Расчет показал, что для ЛИЗ/БП 68.2 молярное отношение составляло 8 : 1 по сравнению с 12 : 1 для системы СП 66.5/ЛИЗ.

Было проведено сравнение величины $q_{\max}$ для систем СП 16.2/ЛИЗ и СП 66.5/ЛИЗ, полученных из данных турбидиметрии, с величинами, определенными на основе отношения зарядов катионных групп ЛИЗ и анионных групп пектина в комплексных смесях. Молекулярный вес образцов пектина составлял 44600 Да, молекулярный вес галактуроновой кислоты – 194 Да. Образование гликозидных связей сопряженное с образованием молекулы воды, уменьшающей массу на 18 Да, и конверсией незаряженной COOH группы в заряженную карбоксилатную форму, приводящую

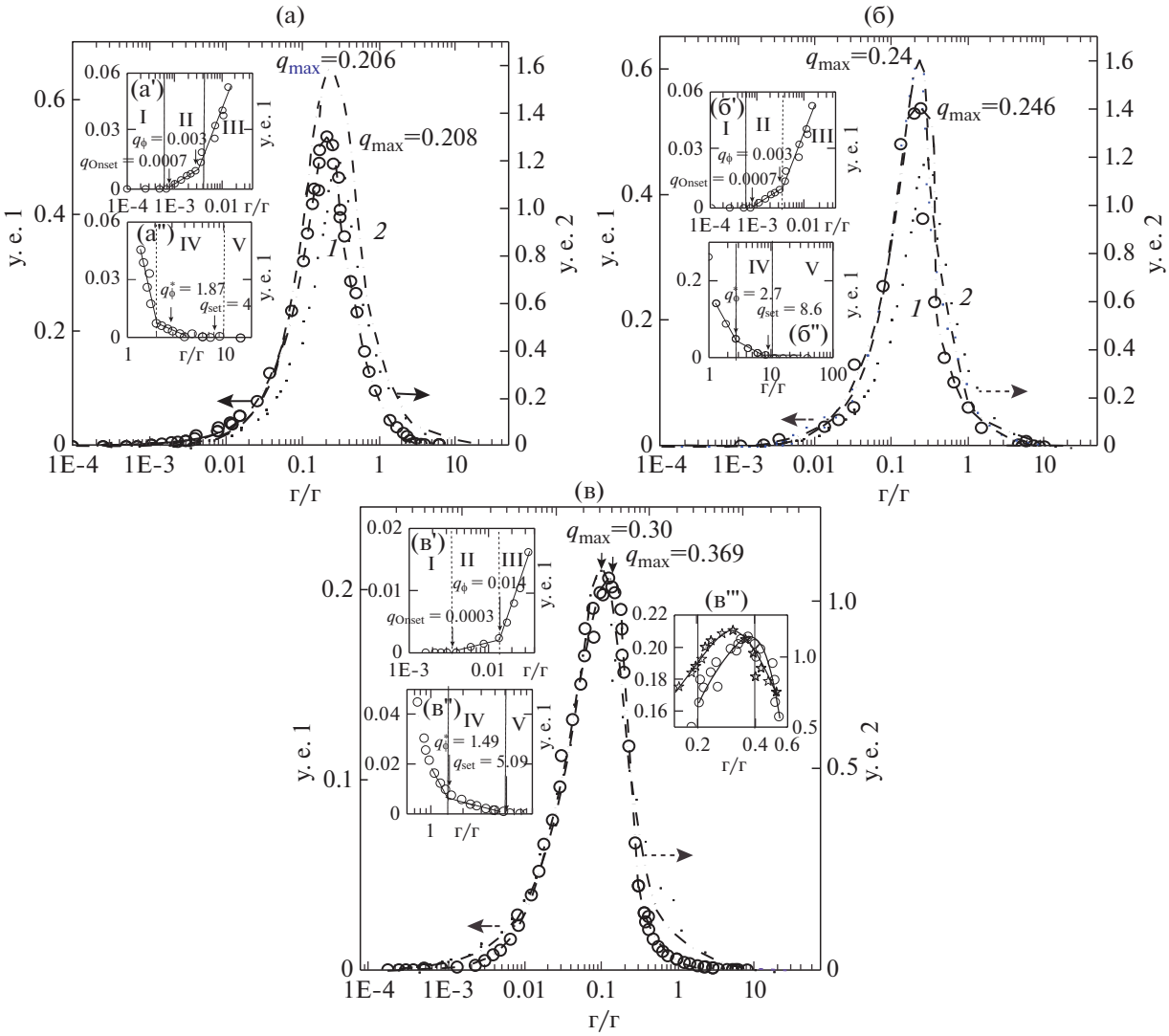

Рис. 2. Зависимость мутности при 500 нм (τ_{500}) от весового соотношения биополимеров (q) для систем СП16.2/ЛИЗ (*2*) и БП16.9/ЛИЗ (*1*, а, а', а"), СП38.2/ЛИЗ (*2*) и БП33.1/ЛИЗ (*1*, б, б', б"), и СП66.5/ЛИЗ (*2*) и БП68.2/ЛИЗ (*1*, в, в', в") при pH 5.1, I = 0.01, 23°C. I – область отсутствия комплексообразования. II – область наличия растворимых комплексов. III – область фазового расслоения. IV – область растворимых комплексов. V – область отсутствия комплексообразования. Концентрации биополимеров до смешения = 0.04%.

к дальнейшей потере 1 Да, а у этерифицированных остатков масса метильных групп увеличивалась на 15 Да. Таким образом, эффективное значение молекулярной массы становилось равным 175 Да для заряженных остатков галактуроната и 190 Да для этерифицированной формы. Количество галактуроновых единиц равно 254.8 (44600 : : 175) для заряженного пектина и 234.7 (44600 : 190) для этерифицированной формы пектина. С одной стороны, принимая во внимание, что содержание галактуроновой кислоты в образцах пектина составляло 85% [21], а степень ее диссоциации в данных условиях – 0.97 [22], можно получить 176.0 отрицательных зарядов на моль СП 16.2 и 64.8 на моль СП 66.5. С другой стороны, один моль 100% ЛИЗ содержал 129 аминокислотных остатков (или 116.1 аминокислотных остатков в используемом образце, содержащем 90% белка) и включал 3.97 положительных зарядов лизина, 8.86 – аргинина, и 0.75 – гистидина [23], то есть 13.5 положительных зарядов на моль. Таким образом, расчетное молярное отношение компонентов в комплексе в случае чистого электростатического взаимодействия составляло бы 18.8 для системы СП 16.2/ЛИЗ. Расчетное молярное соотношение оказалось равным тому, которое было получено из данных турбидиметрии – 18 моль ЛИЗ/моль пектина. Расчетное молярное соотношение ЛИЗ/пектин для системы СП 66.5/ЛИЗ составило 4.8, что оказалось заметно ниже, чем

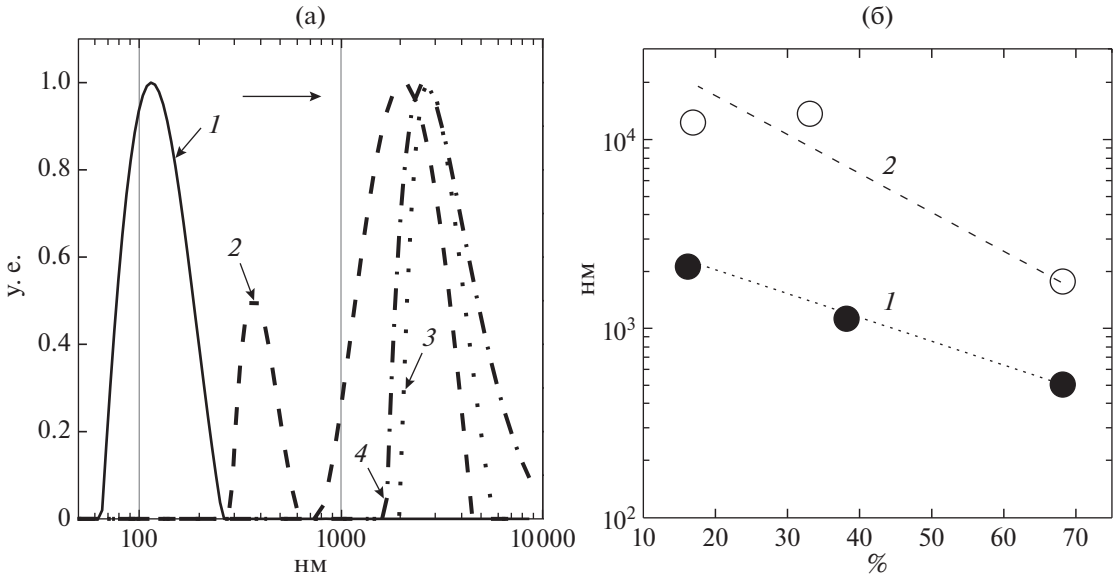

Рис. 3. Зависимость интенсивности светорассеяния в условных единицах (у. е.) от радиуса частиц в нанометрах (нм) для раствора пектина СП16.2 (*1*) и смесей с СП16.2/ЛИЗ при *q* 0.05 (*2*), *q* 0.1 (*3*) и *q* 0.22 (*4*) и концентрации ЛИЗ = = 0.04%, pH 5.1, 23°C, *I* = 0.01 (а). Зависимости средних размеров радиусов комплексных частиц в нанометрах (нм) от СМ пектина (%) для систем: СП/ЛИЗ (*1*) и БП/ЛИЗ (*2*); радиусы определены для соответствующих данной системе значений q_{max}.

определенное на основе данных турбидиметрии (12 моль/моль). Можно предположить, что это могло быть вызвано некоторой агрегацией ЛИЗ в частицах СП 66.5/ЛИЗ.

Системы БП 16.9/ЛИЗ и СП 16.2/ЛИЗ характеризовались весьма низкими значениями q_{Onset} и q_{ϕ}, равными 7×10^{-4} и 3×10^{-3} для первой системы (рис. 2а, 2а') и 6×10^{-4} и 2.5×10^{-3} для системы СП 16.2/ЛИЗ (данные не показаны). Эти значения возрастали с увеличением СМ пектина и особенно значительно для пектинов с максимальной СМ, которые оказались 3×10^{-3} и 14×10^{-3} для системы БП 68.2/ЛИЗ (рис. 2в, 2в') и 6×10^{-3} и 35×10^{-3} для системы СП 66.5/ЛИЗ (данные не показаны). Полученные данные указывали на то, что ЛИЗ взаимодействовал с пектинами, образуя водорастворимые и водонерастворимые комплексы при очень низких концентрациях последнего. Как следует из приведенных данных, основное различие между системами с СП и БП проявлялось для пектинов с высокой СМ = 66.5–68.1. Величина q_{max} для системы БП 68.2/ЛИЗ, характеризующая в первом приближении стехиометрический состав комплексов, оказалась заметно выше (q_{max} = 0.37), чем для системы СП 66.5/ЛИЗ (q_{max} = 0.30). Другими словами стехиометрический состав первых систем содержит большее количество пектина. Простой расчет показал, что ЛИЗ/БП68.2 молярное отношение составляло 8 : 1 по сравнению с 12 :1 для системы ЛИЗ/СП 66.5.

Размеры комплексных частиц. Размер частиц комплекса при разных СМ пектина определяли методом динамического светорассеяния (**ДС**). Все измерения были проведены при постоянной концентрации биополимеров 0.04 вес. % в области значений *q* от 0.05 до 1.0. На рис. 3а представлентипичные функции интенсивности светорассеяния от распределения частиц по размерам для раствора СП 16.2 и смесей СП 16.2/ЛИЗ при трех значениях *q*. Средний радиус молекулы ЛИЗ составлял 1.9 нм, как было показано в нашей предыдущей публикации [24], что соответствовало литературным данным [25].

В бинарных растворах молекулы пектина присутствовали в виде ассоциатов, размеры которых составляли в зависимости от СМ полимера от 104 до 114 нм (рис. 3а, кривая *1*). Данные ДС, полученные для смесей СП/ЛИЗ и БП/ЛИЗ с пектином с различной степенью СМ, показали наличие как общих закономерностей, так и значительных различий. Так, в присутствии даже незначительного количества пектина в растворе ЛИЗ (например, при *q* = 0.05) во всех изученных системах образовывались частицы комплекса большего размера, чем частицы пектина (рис. 3а). При этом средние размеры комплексных частиц зависели как от СМ пектина в смеси, так и от характера распределения метоксильных групп (рис. 3б).

Системы СП/ЛИЗ. Наибольший средний размер частиц комплекса (2030 нм) наблюдался для системы СП 16.2/ЛИЗ. Размеры комплексов

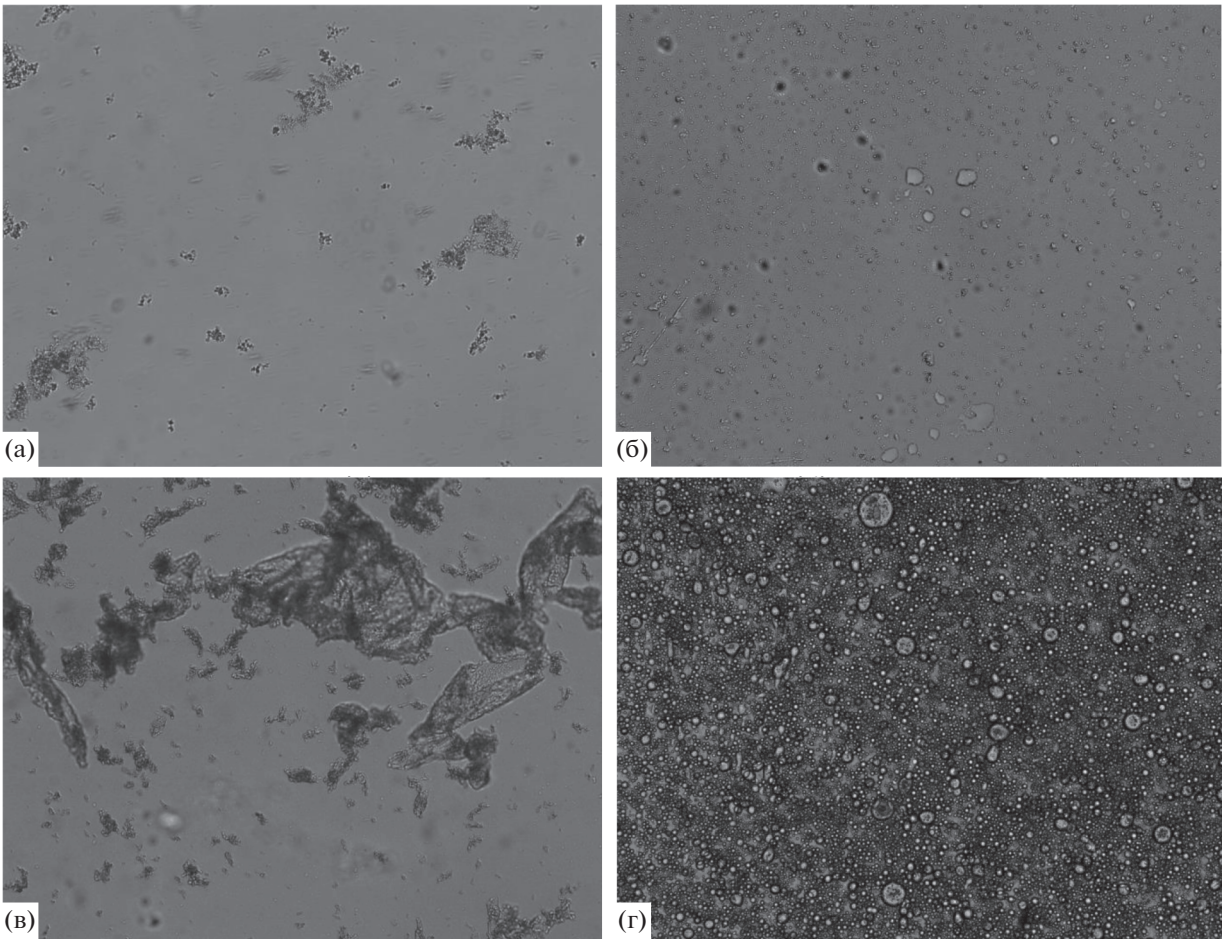

Рис. 4. Микрофотографии комплексов смесей БП 68.2/ЛИЗ (а, в) и СП 66.5/ЛИЗ (б, г) при значениях $q = q_{max}$, pH 5.1, 23°C и $I = 0.01$; ЛИЗ: (а, б) – 0.04%, а (в, г) – 0.4%. Полная длина изображения – 120 мкм.

уменьшались с возрастанием СМ до 419 нм для системы СП 66.5/ЛИЗ (рис. 3а, 3б). Зависимость интенсивности светорассеяния от q носила экстремальный характер для всех изученных систем с максимальным значением q_{max}, соответствующим тому, который был найден методом турбидиметрии (рис. 2). С дальнейшим увеличением q размеры частиц комплекса уменьшались и при $q \gg q_{max}$ становились равными размерам частиц пектина (данные не представлены). Средние размеры частиц смесей СП 95.1/ЛИЗ были идентичны размерам частиц СП 95.1 (данные не представлены). Это позволило утверждать, что ЛИЗ не взаимодействовал с СП 95.1 с образованием комплексных частиц.

Системы БП/ЛИЗ. При одинаковых степенях СМ частицы комплекса систем БП/ЛИЗ оказались значительно больше, чем систем СП/ЛИЗ (рис. 3б). Можно предположить, что в этом случае комплексы на основе БП более агрегированы, чем комплексы на основе СП. Это могло быть следствием более высокой способности БП к агрегации в кислой среде в присутствии моновалентных ионов, которые индуцируют агрегацию их жестких цепей. Такая агрегация может возникать, например, вследствие кооперативного взаимодействия [26] между блоками в БП, которое более кооперативное, чем в случае СП. Следует отметить, что при одинаковых СМ растворимость БП всегда была меньше, чем СП (данные не приведены).

Морфология комплексных систем. Для анализа морфологии комплексных систем пектин/ЛИЗ была применена микроскопия высокого разрешения. Частицы комплексной фазы систем, содержащих БП, представляли собой гель и имели нерегулярную форму при всех изученных значениях СМ. Морфология типичной комплексной системы БП 68.2/ЛИЗ представлена на рис. 4а. При фиксированном значении q средние размеры таких комплексов значительно возрастали при увеличении концентрации ЛИЗ от 0.04 до 0.4 вес. % (рис. 4в). Морфологии систем СП 16.2/ЛИЗ и СП 38.2/ЛИЗ и БП/ЛИЗ оказалась близкими, но различалась только средними размерами частиц.

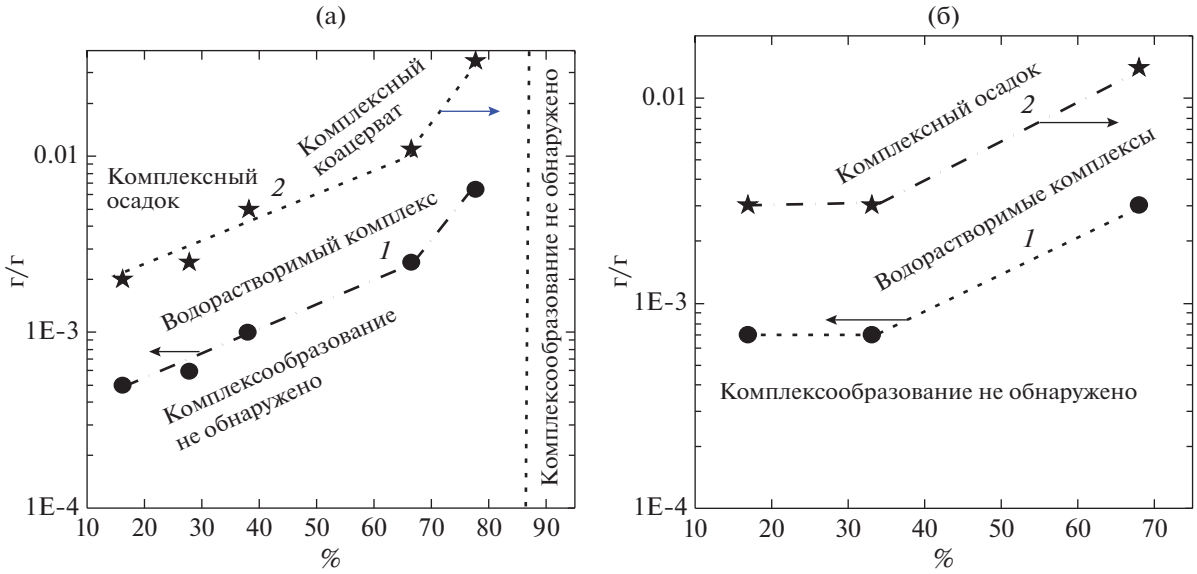

Рис. 5. Зависимости q_{Onset} (*1*) и q_{ϕ} (*2*) от СМ пектина в системе СП/ЛИЗ 90 (а) и q_{Onset} (*1*) и q_{ϕ} (*2*) от СМ пектина в системе БП/ЛИЗ (б) при pH 5.1, 23°C и $I = 0.01$.

Система СП66.5/ЛИЗ, содержащая пектин с высокой степенью метоксилирования, имела жидкие капли комплексного соацервата, то есть морфология ее комплексной фазы, отличалась от других систем (рис. 4б, 4г). Можно предположить, что при низких значениях СМ переход комплексной фазы систем СП/ЛИЗ из гелеобразного состояния к жидкому состоянию при высоких СМ вызывался значительным уменьшением суммарного заряда пектина, которое в значительной степени подавляло межмолекулярные взаимодействия, приводящие к увеличению мобильности в комплексах. Следует отметить, что комплексная коацервация обычно наблюдается в системах белок/слабый полиэлектролит [27].

На рис. 5 в обобщенном виде наглядно показано влияние структурных особенностей СП (а) и БП (б) на их комплексообразование с ЛИЗ.

Влияние ионной силы и pH на комплексообразование. *Системы СП/ЛИЗ.* Зависимость τ_{500} систем СП/ЛИЗ от pH для разных значений СМ показаны на рис. 6а. Измерения осуществляли при значениях $q = q_{max}$, ионной силе $I = 0.01$ и pH 5.1. Из представленных данных видно, что в области pH от 6.5 до 10.0 мутность систем, содержащих сильно заряженные пектины, изменялась слабо при изменении pH, в то время как мутность систем, содержащих слабо заряженные пектины, значительно уменьшалась с возрастанием pH (рис. 6а). Принимая во внимание, что в данной области значений pH карбоксильные группы пектина полностью ионизированы [22] и положительный заряд ЛИЗ уменьшался монотонно до pH 9–10 [28], можно утверждать, что в этих условиях комплексообразование СП 16.2 с ЛИЗ зависело слабо от заряда ЛИЗ, в то время как комплексообразование высокометоксилированного СП 66.5 – существенно. Другая ситуация наблюдалась при изменении pH от 5.2 до 6.2. В этой области pH ≥ 6.0 молекулы пектина и ЛИЗ становились полностью ионизированными [22]. Как видно на рис. 6а, комплексообразование пектина с ЛИЗ сильно зависело от степени диссоциации молекул пектина и почти не зависело от его СМ. При возрастании pH от 10.0 до 10.5 заряд ЛИЗ резко падал к нулевому значению [28]. В связи с этим комплексообразование подавлялось даже в случае высокозаряженных пектинов. Минимальное значение pH, при котором величина τ_{500} становилась равной нулю (pH_{set}), уменьшалось линейно с СМ пектина (рис. 6а'). Это подтверждало электростатический характер межмолекулярного взаимодействия пектина с ЛИЗ и отсутствие заметного влияния на него водородных связей.

Зависимость τ_{500} системы СП/ЛИЗ от *I* при разных значениях СМ пектина представлены на рис. 6б. Для высокозаряженных СП 16.2 и СП 38.2 эта зависимость имела немонотонный характер с максимумом комплексообразования при $I \approx 0.03$. Сходная немонотонная зависимость наблюдалась и в случае других белок/полисахарид и белок/полиэлектролит систем, в которых белок характеризовался неравномерным распределением заряда в некоторых участках его поверхности. Такая немонотонная зависимость объяснялась эффектами противоионов солей при экранирующем отталкивании, ослабляющем взаимодействие [29]. Минимальное значение *I,* выше которого ком-

плексообразование подавлялось (I_{set}), зависело от общего заряда пектина, что подтверждало электростатический характер комплексообразования. Монотонное изменение зависимости τ_{500} от I для систем с высокометоксилированными пектинами СП 66.5 и СП 77.7 могло являться следствием действия очень слабых близких сил притяжения, которые экранировали отталкивание между макроионами. Зависимость I_{set} систем СП/ЛИЗ от СМ пектина представлена во вставке к рис. 6б'. Величина I_{set} уменьшалась с увеличением СМ, особенно значительно при СМ выше 60%. Отклонение зависимости от линейной при высоких степенях СМ могло быть результатом приближения константы связывания к критической величине, при которой комплексы не образовывались. Можно предположить, что на значение I_{set} для систем с низко метоксилированными пектинами степень СМ влияла так же, как на q_{Onset} и $q_ф$ (рис. 5а). Полное подавление комплексообразования при определенных значениях I даже в случае высокометоксилированных пектинов доказывало, что роль образования водородных взаимодействий в комплексообразовании незначительна.

Системы БП/ЛИЗ. Зависимость τ_{500} систем БП/ЛИЗ от pH для разных значений СМ показаны на рис. 7а. Сравнение полученных данных для систем БП/ЛИЗ и СП/ЛИЗ показало одно принципиально значимое различие между двумя типами систем. Минимальное значение pH, при котором величина τ_{500} систем БП/ЛИЗ становилась равной нулю (pH_{set}) не зависело от СМ пектина, то есть от суммарного заряда его молекулы, в то время как для систем СП/ЛИЗ значение pH_{set} уменьшалось с ростом СМ. Это позволило констатировать, что основным фактором, определяющим комплексообразование в системах БП/ЛИЗ в щелочной области pH, являлся не суммарный заряд, а агрегация частиц комплекса, управляемая вторичными физическими связями-гидрофобными взаимодействиями и водородными связями. В области значений pH от 5 до 9.5 положительный заряд ЛИЗ уменьшался монотонно с ростом pH [27], при этом карбоксильные группы пектина полностью ионизированы [22]. В связи с этим ожидаемым результатом было бы уменьшение τ_{500} с увеличением pH. Однако сильная агрегация частиц комплекса в данных условиях увеличивала стабильность комплексов при более высоком значении pH. Природа сил, ответственных за агрегацию частиц комплекса, не вполне ясна.

Зависимость τ_{500} системы БП/ЛИЗ от I при разных значениях СМ пектина представлены на рис. 7б. Одна общая особенность в поведении систем, содержащих СП и БП, заключалась в том, что минимальное значение I, при котором τ_{500} достигало нулевого значения (I_{set} = 0.1), было одинаковым для сильно заряженных СП и БП. Для сильно заряженных БП 16.9 and БП 33.1 зависимость τ_{500} от I носила немонотонный характер с максимумом при $I \approx 0.06$. Возможной причиной для небольшого сдвига I_{max} от 0.03 до 0.06 в случае этих систем БП16.9/ЛИЗ и БП33.1/ЛИЗ могло быть более выраженное экранирование отталкивания вследствие более сильной агрегации в системах

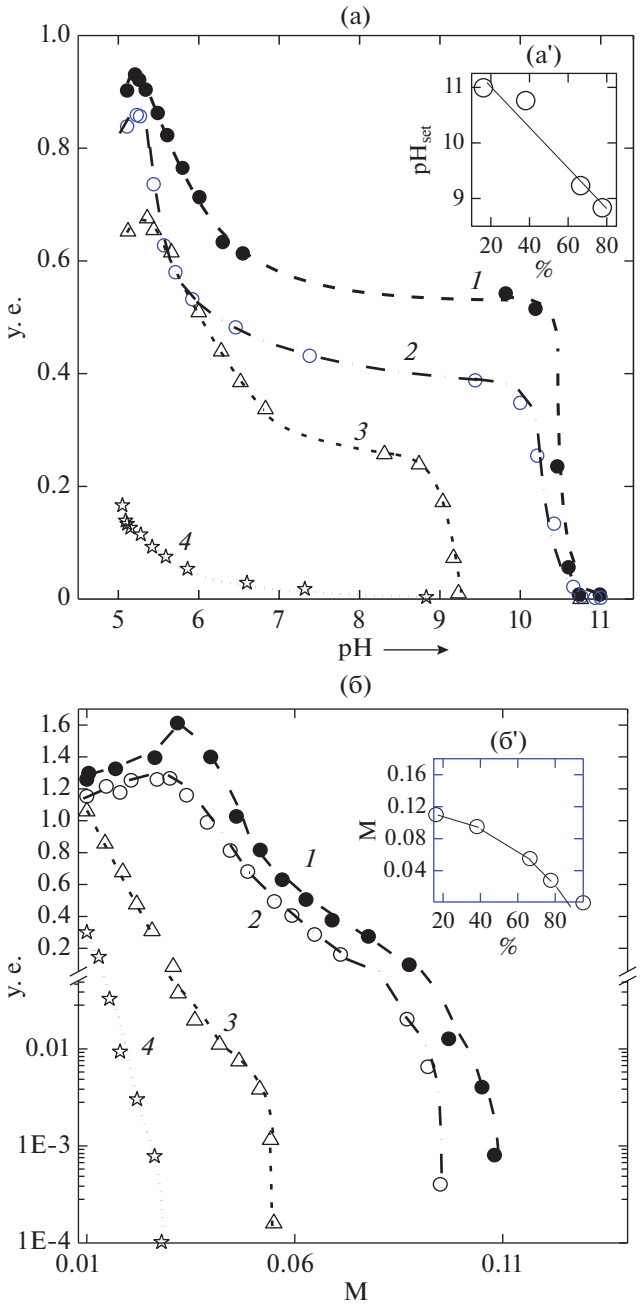

Рис. 6. Зависимость мутности при 500 нм (τ_{500}) смесей СП/ЛИЗ от pH при ионной силе I = 0.01 (а) и при I = 0.01 и pH 5.1(б) для пектинов с СМ от 16.1 (линия *1*) до 77.7 (линия *4*). Концентрация ЛИЗ = 0.04%, $q = q_{max}$. б' – зависимость I_{set} от СМ пектина.

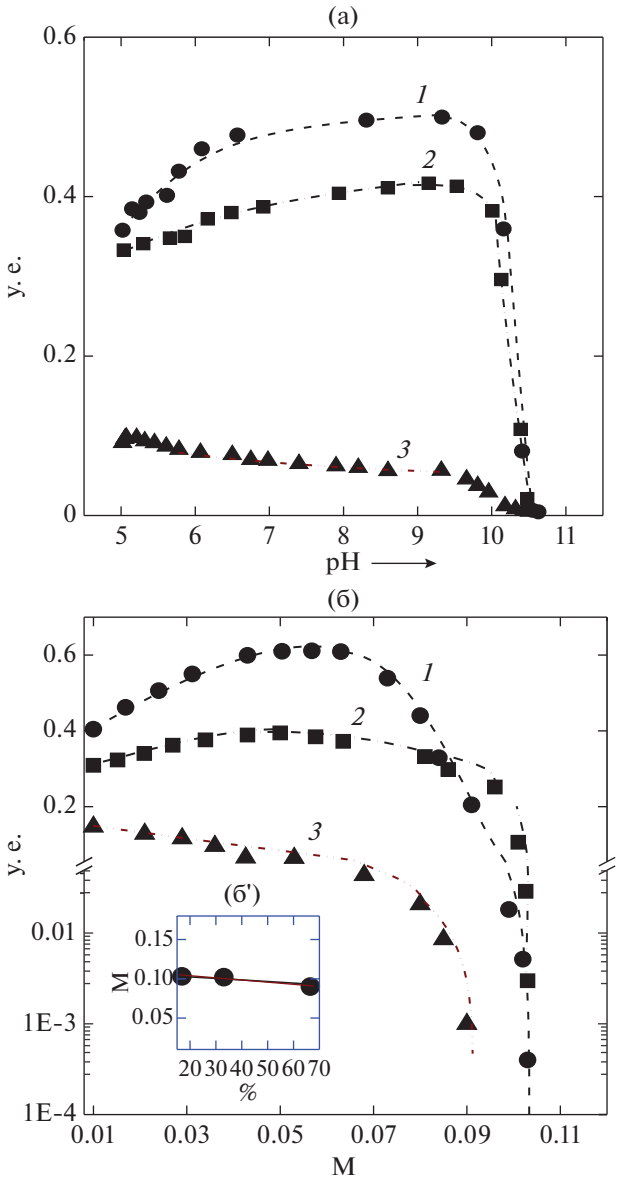

Рис. 7. Зависимость мутности при 500 нм (τ_{500}) смесей БП/ЛИЗ от pH при ионной силе $I = 0.01$ (а) и $I = 0.01$ и pH 5.1 (б) для пектинов с СМ (%) от 16.9 до 68.2. Концентрация ЛИЗ = 0.04%, $q = q_{max}$. (б') – зависимость I_{set} от СМ пектина.

БП/ЛИЗ по сравнению с системами СП/ЛИЗ. Такое поведение согласовывалось с образованием больших по размеру частиц комплекса по сравнению с системами на основе СП (рис. 3 и 4).

Таким образом, полученные данные позволили установить общие закономерности и различия во взаимодействии молекул ЛИЗ с пектинами, различающимися суммарной (СП) и локальной (БП) плотностью заряда. Показано, что СП и БП образовывали водорастворимые комплексы в очень узком диапазоне составов смесей (при q от 7×10^{-4} до 1.4×10^{-2}) в зависимости от СМ пектина, и водонерастворимые комплексы (при q выше 7×10^{-3} и меньше 1.5–3.8). Оптическая микроскопия показала, что комплексы ЛИЗ с БП имели большие размеры (15–20 мкм) при всех изученных СМ, в то время как средние размеры комплексов с СП оказались существенно меньше (от 0.6 до 3 мкм) и зависели от СМ. Фазовый анализ систем показал, что БП образовывали гелеобразые частицы комплекса независимо от СМ, тогда как СП образовывал как жидкие, так и гелеобразные частицы комплекса в зависимости от СМ. Критическое значение I_{set}, выше которого комплексы ЛИЗ с СП и БП не образовывались, оказалось равным 0.11. При этом значения I_{set} и pH_{set} для систем БП/ЛИЗ не зависели от СМ пектина, в то время как для систем СП/ЛИЗ эти значения уменьшались значительно с ростом СМ. Влияние I на комплексообразование ЛИЗ с пектинами имеет немонотонный характер с максимумом при $I = 0.03–0.06$, соответствующим длине Дебая 1.7 нм, сравнимой с размером молекулы ЛИЗ. Полученные результаты могут быть использованы в процессах переработки белка. Так, при низкой ионной силе молекулы ЛИЗ могут обратимо связывать пектины и высвобождаться из комплекса при добавлении соли. Это позволит использовать данные смеси в биотехнологии в качестве переносчиков ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *May C.D.* // Carbohydr. Polym. 1990. V. 12. № 1. P. 79–99.
2. *Serov A.V., Antonov Y.A., Tolstoguzov V.B.* // Die Nahrung.1985. V. 29. № 1. P. 19–30.
3. *Tolstoguzov V.B.* Functional Properties of Food Macromolecules / Eds. J.R. Mitchell, D. A. Ledward. N, Y.: Elsevier, 1986. P. 385–415.
4. *Tolstoguzov V.B.* // Food Hydrocolloids. 1991. V. 4. № 6 P. 429–468.
5. *Antonov Y.A., Grinberg W.Y., Tolstoguzov V.B.* // Die Starke. 1975. V. 27. № 12 P. 424–431.
6. *Antonov Y.A., Lozinskaya N.V., Grinberg V.Y., Dianova V.T., Tolstoguzov V.B.* // Colloid Polym. Sci. 1979. V. 257. № 11. P. 1159–1171.
7. *Antonov Y.A., Grinberg V.Y., Zhuravskaya N.A., Tolstoguzov V.B.* // Carbohydr. Polym. 1982. V. 2. № 1. P. 81–90.
8. *Antonov Y.A., Kiknadze E.V.* // Die Nahrung. 1987. V. 31. № 1 P. 57–61.
9. *Antonov Y.A., Lashko N.P., Glotova Y.K., Malovikova A., Markovich O.* // Food Hydrocoll. 1996. V. 10. № 1. P. 1–9.
10. *Antonov Y.A., Soshinsky A.A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2000. V. 27. № 4. P. 279–285.
11. *Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 20. P. 6043–6049.
12. *Gummel J., Boue´ F., Deme´ B., Cousin F.* // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. № 49. P. 24837–24846.

13. *Girard M., Sanchez C., Laneuville S.I., Turgeon S.L., Gauthier S.F.* // Colloids Surface B: Biointerfaces. 2004. V. 35. № 1. P. 15–22.

14. *Gilsenan P.M., Richardson R.K., Morris E.R.* // Food Hydrocoll. 2003. V. 17. № 6. P. 723–737.

15. *Maroziene A., De KruifC.G.* // Food Hydrocoll. 2000. V. 14. № 4. P. 391–394.

16. *Carlsson F., Lines P., Malmsten M.* // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. № 38. P. 9040–9049.

17. *van de Weert M., Andersen M.B, Frokjaer S.* // Pharm. Res. 2004. V. 21. № 12. P. 2354–2359.

18. *Celus M., Kyomugasho C., Kermani Z.J., Roggen K., Van Loey A.M., Grauwet T., Hendrickx M.E.* // Food Hydrocoll. 2017. V. 73. № 1. P. 101–109.

19. *Aune K.C., Tanford C.* // Biochemistry. 1969. V. 8. № 11. P. 4579–4585.

20. *Kuehner D.E., Engmann J., Fergg F., Wernick M., Blanch H.W., Prausnitz M.* // J. Phys. Chem. B. 1999. V. 103. № 8. P. 1368–1374.

21. *Ngouemazong D.E., Tengweh F.E., Duvetter T., Fraeye I., Van Loey A.,Moldenaers P., Hendrickx M.* // Food Hydrocoll. 2011. V. 25. № 4. P. 434–443.

22. *Kohn R.* // Carbohydr. Res. 1987. V. 160. № 4. P. 343–353.

23. *Levis J.C., Snell N.S., Hirschmann D.J., Fraenkel-Konrat H.* // J. Biol. Chem. 1950. V. 186. № 1. P. 23–36.

24. Антонов Ю.А., Журавлева И.Л. // Прикл. Биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 3. P. 222–230.

25. *Parmar A.S., Muschol M.* // Biophys. J. 2009. V. 97. № 2. P. 590–598.

26. *Ström A., Schuster E., MengGoh S.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 113. № 3. P. 336–343.

27. *De Kruif C.G., Tuinier R.* // Food Hydrocoll. 2001. V. 15. № 4. P. 555–563.

28. *Bharti B.* // Adsorption, Aggregation and Structure Formation in Systems of Charged Particles: From Colloidal to Supracolloidal Assembly Heidelberg, N.Y., London, Dorfrecht: Springer, 2014. 150 p.

29. *Seyrek E., Dubin P.L., Tribet C., Gamble E.A.* // Biomacromolecules. 2003. V. 4. № 2. P. 273–282.

Effect of Structural Features of Pectin on Its Complexation with Lysozyme

Y. A. Antonov[a, *] and I. L. Zhuravleva[a]

[a] *N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: chehonter@yandex.ru*

Interaction of lysozyme (Lys) with pectins differing in total or local charges (blockwise and statistical distribution of the methoxylated groups, BP and SP), and also different degree of methoxylation (DM) was studied by use of dynamic light scattering, turbidimetry, brightfield imaging, and electrophoretic mobility. SP 16.2, 38.2, and BP 16.9, 33.1 form at pH 5.1, ionic strength $I = 0.01$, and $q < q_{max}$ water soluble complexes in the concentration range of mixtures from $q \cong 7 \times 10^{-4}$ до $q = 3.0 \times 10^{-3}$, where q-pectin/Lys weight ratio, and water insoluble complexes at $q > 3 \times 10^{-3}$. For SP 66.5 and BP 68.2 these values were higher (from $q \cong 3 \times \times 10^{-3}$ to $q \cong 0.01$, and $q > 0.01$). Complexes of Lys with BP has large sizes (15–20 μm) for all DM, whereas the average sizes of complexes Lys/SP are much less (from 0.6 μm to 3 μm) and they depened on DM. Complexes of Lys with BP has gel-like morphology for all DM, whereas complexes with SP were liquid coacervate or gel like depending on on DM. Critical values of the ionic strength I_{set}, above that complexes did not formed was 0.11. At that, I_{set} and pH_{set} values for BP/Lys systems were not depended on DM of pectin. For SP/Lys systems these values decreases when DM increase. Effect of I on complexation has a nonmonotonic character displaying a maximum in complex formation at $I = 0.03$–0.06. Understanding of effect of the total and local charges of pectin on its complexation with protein is important for prediction of the structural stability of food products.

Keywords: pectin, lysozyme, complexation, total charge, local charge, structure

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 46–53

УДК 577.152.34

ХАРАКТЕРИСТИКА И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРОМИЦЕТА *Sarocladium strictum*

© 2021 г. Е. И. Корниенко[1], А. А. Осмоловский[1, *], В. Г. Крейер[1], Н. А. Баранова[1], И. Б. Котова[1], Н. С. Егоров[2]

[1]*Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия*

[2]*Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия*

**e-mail: aosmol@mail.ru*

Поступила в редакцию 26.06.2020 г.
После доработки 14.08.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Получен и охарактеризован препарат тромболитических ферментов микромицета *Sarocladium strictum* 203. Показана выраженная урокиназная активность синтезируемых продуцентом протеиназ. В препарате обнаружено присутствие трех щелочных трипсиноподобных тиолзависимых протеиназ серинового типа с различными изоэлектрическими точками (4.5, 7.2 и 11.8) и близкими значениями молекулярных масс (~35 кДа). Одна из протеиназ (протеиназа III) оказалась негликозилированой, а остальные – гликопротеины. Протеиназы различались по спектру протеолитической активности по отношению к белкам–компонентам тромбов. Предположительно, урокиназная активность ферментов обусловила активирующее действие протеиназ на плазминоген.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитическая активность, тромболитические ферменты, активаторы плазминогена

DOI: 10.31857/S0555109921010293

В последнее время активно накапливаются сведения о разнообразии строения и функций протеолитических ферментов, а также расширении возможностей их применения, что делает их изучение одним из актуальных направлений в современной энзимологии [1, 2]. Значительный практический интерес представляют протеиназы, которые имеют перспективу применения или уже применяющиеся в медицине, в особенности для лечения или диагностики тромбоэмболических осложнений. В связи с этим активно изучаются, как правило, протеиназы микроорганизмов, особенно мицелиальных грибов, обладающие очевидными биотехнологическими преимуществами перед другими источниками [3].

В последнее время перспективные продуценты протеиназ найдены среди микромицетов, которые относятся к представителям различных эколого-трофических групп: сапротрофов, фито- и энтомопатогенов [4–7]. Однако для применения грибных протеиназ в качестве тромболитиков, как прямого, так и непрямого действия, необходимо учитывать их специфичность к компонентам тромбов и возможные патофизиологические эффекты [8], поэтому сведения о фибринолитической активности протеиназ микромицетов постоянно расширяются и дополняются. К перспективным продуцентам протеиназ направленного действия можно отнести такие новые штаммы микромицетов, как *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 [5], *A. japonicum* KSS05 [9], *A. niger* [10], *A. ochraceus* L-1 [11, 12], *A. oryzae* KSK-3 [13], *Arthrobotrys longa* 1 [14], *Mucor subtilissimus* UCP 1262 [15, 16], *Neurospora sitophila* [17], *Paecilomyces tenuipes* [18], *Sarocladium strictum* 203 [19, 20] и *Tolypocladium inflatum* k1 [21]. Изучение свойств протеаз, продуцируемых большинством из них, показало, что они различаются как по оптимальным параметрам проявления активности, так и по субстратной специфичности.

Протеиназы штамма *S. strictum* 203 не были ранее изучены, однако было показано, что, наряду с прямой фибринолитической активностью, они способны проявлять активирующее плазминоген действие (непрямая фибринолитическая активность) [19]. Это свойство протеиназ оказалось необходимым для тромболитических препаратов последних поколений [22]. В связи с этим изуче-

ние свойств протеиназ этого продуцента представляется важным.

Цель работы – выделение и изучение свойств протеиназ микромицета *S. strictum* 203, обладающих фибринолитической и активирующей плазминоген активностью.

МЕТОДИКА

Получение препарата внеклеточных протеиназ *S. strictum*. Для получения препарата протеиназ продуцент культивировали в глубинных условиях в два этапа. На первом этапе культуру микромицета, выращенную на скошенной среде Чапека, переносили в посевную среду и выращивали посевной мицелий (48–72 ч). На втором этапе часть биомассы (10% по объему) переносили в ферментационную среду, выращивание проводили 96–120 ч при температуре 28°C на качалке при 220 об/мин. Среда для биосинтеза ферментов имела следующий состав (в г/л): сахароза – 40.0, K_2HPO_4 – 4.4, $NaNO_3$ – 19.0 и KNO_3 – 2.5, pH 6.5. Среда для посевного мицелия имела тот же состав но концентрация их была уменьшена в 2 раза.

По окончании культивирования культуральную жидкость (**КЖ**) микромицета отделяли от мицелия центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин при 4°C. Белки из КЖ осаждали двукратным объемом ацетона, охлажденным до –20°C, выдерживали в течение 1 ч при 4°C для формирования осадка, а затем фильтровали. Отфильтрованный осадок высушивали над хлористым кальцием в вакуумном эксикаторе в течение 3 сут.

Выделение внеклеточных протеиназ *S. strictum*. Для разделения белков, осажденных из КЖ, использовали препаративное изоэлектрофокусирование (**ИЭФ**) по методу Вестерберга [23]. ИЭФ проводили в колонке объемом 110 мл ("Pharmacia", Швеция) при напряжении 800 В течение 36 ч при 4°C в широком градиенте pH амфолинов (pH 3.0–10.0) и градиенте сахарозы 0–40%. После проведения ИЭФ собирали на холоде фракции объемом 1.5–2 мл, в которых измеряли pH, содержание белка и активность протеиназ.

Электрофорез в ПААГ и определение белков. Гомогенность белков во фракциях после ИЭФ определяли с помощью электрофореза по Лэммли в 15%-ном ПААГ, в присутствии ДДС-Na [24]. Для окраски гелей использовали 0.08%-ный раствор Кумасси бриллиантового голубого G-250 в 3.5%-ной хлорной кислоте [25]. Для определения молекулярной массы протеиназ использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker ("Thermoscientific", США).

Количественное содержание белка в пробах определяли спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути в 1 см [26]. Для расчета концентрации строили калибровочную кривую по БСА.

Определение фибринолитической (плазминоподобной) и активирующей плазминоген активности методом фибриновых пластин. Фибринолитическую и активирующую плазминоген активность определяли на фибриновых пластинках по модифицированному методу Аструпа–Мюллерца–Лассена [4]. Для приготовления фибриновых пластин смешивали 900 мкл 3%-ного раствора бычьего фибриногена и 200 мкл раствора тромбина (2 мг/мл) в физиологическом растворе. Смесь аккуратно перемешивали и переносили в чашки Петри (d = 9 см). Образование и уплотнение фибринового геля происходило в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого часть чашек Петри прогревали в течение 30 мин при 86°C, при этом инактивировали плазминоген. Для измерения фибринолитической и активирующей плазминоген активности на пластины наносили по 30 мкл пробы и инкубировали в течение 4 ч в термостате. Затем на пластинах измеряли площадь зоны лизиса. Разность в размерах зон на непрогретых и прогретых чашках служила показателем способности фермента активировать плазминоген. Данные выражали в усл. ед./мл. За 1 усл. ед. принимали количество фермента, образующего зону гидролиза фибриновой пластины, равную 1 мм^2.

Определение протеолитической активности при гидролизе белков-субстратов. В полученном препарате внеклеточных протеиназ и фракциях после ИЭФ проводили реакции казеинолиза, фибринолиза и фибриногенолиза с 1%-ными суспензиями соответствующих белков в 0.05 М трис-HCl буфере, pH 8.2.

Для проведения реакций к 200 мкл фильтрата культуральной жидкости добавляли 400 мкл 1%-ной суспензии фибрина в 0.05 М трис-HCl буфере, pH 8.2, и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 10–30 мин при 37°C [11, 27]. Активность выражали в мкмолях тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{Тир}$).

Определение протеолитической активности с использованием хромогенных пептидных субстратов. Для определения амидолитической активности выделенных протеиназ проводили инкубацию с 0.05%-ными растворами хромогенных пептидных субстратов ("Chromogenix", Италия) – *n*-нитроанилидов, расщепляемых протеиназами системы гемостаза: тромбином – Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, плазмином – H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), фактором Xa – Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), урокиназой – pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444) и тканевым активатором плазминогена – H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288).

Реакцию проводили в 200 мкл пробы при постоянном перемешивании в течение 5 мин при

37°C, как описано ранее [28]. Оптическую плотность измеряли при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (“Hitachi”, Япония). За 1 единицу активности (E_{pNA}) принимали количество мкмоль *n*-нитроанилина, образовавшегося в результате гидролиза за 1 мин.

Ингибиторный анализ. В качестве ингибиторов для металлопротеиназ использовали этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, 1.1 мг/мл) и *о*-фенантролин (0.5 мг/мл), цистеиновых протеиназ – *n*-хлормеркурийбензоат (*n*-ХМБ, 0.5 мг/мл) и сериновых протеиназ – фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ, 0.3 мг/мл), а также ингибиторы химотрипсиноподобных протеиназ – тозилфенилаланилхлорметилкетон (ТФХК, 0.4 мг/мл) и трипсиноподобных протеиназ – тозиллизилаланилхлорметилкетон (**ТЛХК**, 0.4 мг/мл) и соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл). При изучении действия ингибиторов молярное соотношение фермент-ингибитор составляло 1 : 10 и 1 : 100 [29]. Начальную и остаточную протеолитическую активность фермента определяли при 37°C после его преинкубации с ингибитором в течение 120 мин при 25°C, как описано выше, и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Определение pH-оптимума, pH-стабильности, термостабильности и температурного оптимума ферментов. Для изучения pH-стабильности и оптимума pH для действия ферментов использовали 0.4 М натрий-ацетат-фосфат-боратный буфер со значениями pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 и 11.0.

Для определения pH-стабильности 100 мкл пробы и 150 мкл буфера инкубировали в течение 3 ч при 25°C. Затем добавляли 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы в 0.05 М трис-HCl-буфере, pH 8.2, и инкубировали еще в течение 5 мин при 37°C. Для определения pH-оптимума 100 мкл пробы ферментов, 150 мкл буфера и 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы инкубировали в течение 5 мин при 37°C.

Для измерения термостабильности фермента 50 мкл пробы и 200 мкл 0.05 М трис-HCl-буфера, pH 8.2, инкубировали в течение 3 ч при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C, а затем добавляли 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Для измерения температурного оптимума действия фермента 50 мкл пробы, 200 мкл буфера и 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы инкубировали в течение 5 мин при соответствующей температуре.

Реакцию останавливали 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты, и измеряли поглощение при 405 нм.

Определение углеводного компонента протеиназ. Присутствие в составе выделенных протеаз углеводного компонента выявляли методом дот-блоттинга, инкубируя нанесенные на нитроцеллюлозные мембраны пробы в растворах периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты), как описано ранее [30]. В качестве положительного контроля использовали раствор 0.5 мг/мл внеклеточной дрожжевой инвертазы, а в качестве отрицательного – раствор 0.5 мг/мл БСА.

Тромболизис. Для приготовления тромбов во взвешенных пробирках-эппендорфах смешивали 200 мкл плазмы и 20 мкл 0.1%-ного раствора тромбина в 0.1 М трис-HCl-буфере, pH 7.0, и оставляли на 30 мин при 37°C, после чего повторно взвешивали со стабилизированным тромбом. Затем добавляли 250 мкл пробы и инкубировали при перемешивании (250 об./мин) в течение 30, 60 и 90 мин при 37°C. При этом наблюдалось частичное разжижение тромба и отделение его от стенок пробирки. Лизат аккуратно убирали при помощи фильтровальной бумаги и взвешивали остаток вместе с пробиркой. После чего рассчитывали количество, в %, не прогидролизованного тромба [5].

Ферментативные реакции, требующие постоянного перемешивания, проводили в термошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия). Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр BioSpectrometer® kinetic (“Eppendorf”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микромицет вида *S. strictum* (W. Gams) Summerbell был выделен из полифилетичного рода *Acremonium* в 2011 г. Он принадлежит к анаморфам грибов аскомицетного аффинитета рода *Sarocladium*, семейства *Sarocladiaceae*, порядка *Hypocreales*, класса *Sordariomycetes*, отдела Ascomycota. Эти грибы занимают различные экологические ниши и выделяются из почвы и растительных остатков. Среди них встречаются фитопатогенные и ассоциированные с другими грибами формы. Штамм *S. strictum* 203 был выделен из культуры *A. longa* Mecht. 1 как микофил – перспективный продуцент фибринолитических протеиназ [20].

Изучение в культуральной жидкости *S. strictum* 203 активности внеклеточных протеиназ по отношению к белковым компонентам тромба и хромогенным пептидным субстратам подтвердило сделанное ранее предположение об их возможности осуществлять реакцию активации плазминогена. Как видно из табл. 1, протеиназы микромицета были способны расщеплять субстраты плазмина, тромбина и фактора Ха, а также проявляли активность активаторов плазминогена: тканевого (по субстрату D-Ile-Pro-Arg-pNA) и урокиназы (по субстрату pGlu-Gly-Arg-pNA). Важно отметить, что в среднем значение активности урокиназы в 1.7 раз превышало значение активности по отношению к другим исследованным субстратам.

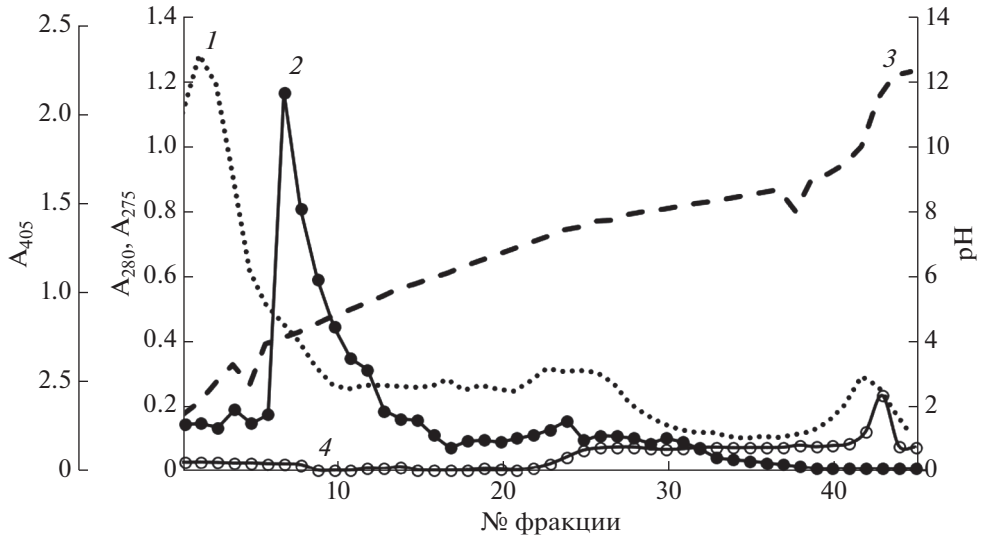

Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата протеиназ *S. strictum* 203; *1* – A_{280}, *2* – активность урокиназы, *3* – pH, *4* – казеинолитическая активность.

Можно предположить, что активация плазминогена протеазами *S. strictum* 203, выявленная ранее, происходила по урокиназному типу. В связи с этим субстрат урокиназы был использован в дальнейшем для определения специфической активности протеиназ продуцента.

Для изучения протеолитического комплекса *S. strictum* 203 был получен препарат его внеклеточных протеиназ осаждением сульфатом аммония из КЖ гриба. Препарат представлял собой гомогенный порошок желтовато-белого цвета без запаха, хорошо растворимый в воде.

Проведение ИЭФ препарата позволило обнаружить в составе протеолитического комплекса продуцента как минимум 3 протеиназы (обозначенные как протеиназы I, II и III) с p*I* 4.5, 7.2 и 11.8 (рис. 1). При использовании для определения протеолитической активности во фракциях, полученных после ИЭФ, двух субстратов – казеина и хромогенного пептидного субстрата урокиназы, были отмечены различия в степени их гидролиза различными протеиназами. Так, в отличие от протеиназы III, протеиназы I и II обладали низкой казеинолитической активностью и проявляли большую урокиназную активность (рис. 1). Все выделенные ферменты при проведении электрофореза в ПААГ оказались гомогенными белками с молекулярной массой около 35 кДа (рис. 2), что могло свидетельствовать о том, что они являлись изоферментами. Подобная характеристика была также показана для протеиназ, образующих протеолитические комплексы у других микромицетов [12, 32].

Изучение субстратной специфичности выделенных протеиназ показало, что их активность по отношению к исследуемым субстратам тканевого активатора плазминогена и плазмина различалась. Так, протеиназа I не действовала на эти субстраты, протеиназа II не обладала активностью по отношению к субстрату тканевого активатора плазминогена и слабо гидролизовала субстрат плазмина, а протеиназа III расщепляла оба субстрата (рис. 3). При этом две протеиназы проявляли выраженную урокиназную активность. Наибольшей активностью по отношению к субстрату урокиназы обладала протеиназа II (170.0 E_{pNA}/мг × × 10^{-3}). Протеиназа I обладала более узкой субстратной специфичностью с выраженной урокиназной активностью, а протеиназа III проявляла широкую субстратную специфичность. Можно

Таблица 1. Активность протеиназ микромицета *S. strictum* 203 по отношению к хромогенным пептидным субстратам

Активность	Субстрат	Активность, E_{pNA}/мг × 10^{-3}
Плазминоподобная	H-D-Val-Leu-Lys-pNA	30.9
Тромбиноподобная	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	34.7
Активность тканевого активатора плазминогена	D-Ile-Pro-Arg-pNA	31.2
Урокиназная	pGlu-Gly-Arg-pNA	58.7
Фактор Ха-подобная	Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	32.4

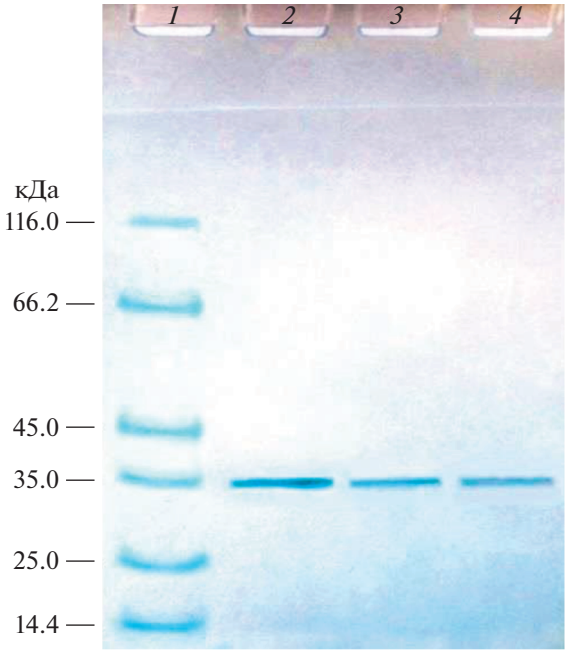

Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС–Na протеиназ *S. strictum* 203 : *1* – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз : β-галактозидаза, БСА, овальбумин, лактатдегидрогеназа, эндонуклеаза рестрикции Bsp981, бета-лактоглобулин, лизоцим), *2* – протеиназа I, *3* – протеиназа II, *4* – протеиназа III.

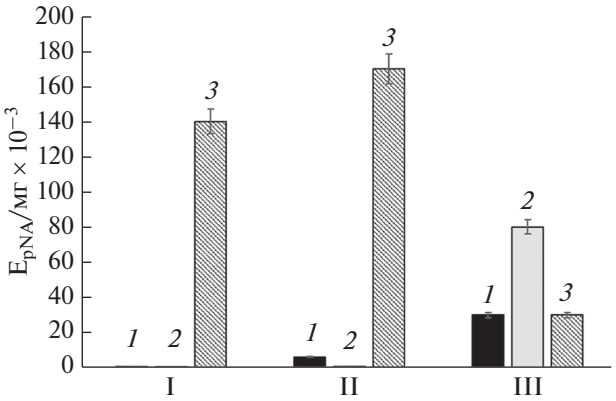

Рис. 3. Амидолитическая активность протеиназ *S. strictum* 203 (I, II и III) по отношению к хромогенным пептидным субстратам плазмина (*1*), тканевого активатора плазминогена (*2*) и урокиназы (*3*).

предположить, что урокиназная активность и обусловливала активирующее плазминоген действие.

Методом фибриновых пластин были обнаружены фибринолитическая и активирующая плазминоген активность исследуемых протеиназ (табл. 2). Первые две протеиназы характеризовались высокой фибринолитической (193.6 и 169.8 усл. ед./мг соответственно) и активирующей плазминоген активностью (443.7 и 414.2 усл. ед./мг соответственно). Протеиназа III оказалась более активной (в 3.4 и 1.6 раз соответственно) и гидролизовала субстрат с одинаковой активностью, не проявляя выраженного активирующего плазминоген действия.

Фибринолитическая и фибриногенолитическая активность у протеиназ I и II была выражена слабо (табл. 2). Протеиназа III проявляла как фибрино- так и фибриногенолитическую активность (191.6 и 217.7 $E_{Тир}$/мг).

Для установления класса изучаемых протеиназ был проведен ингибиторный анализ (табл. 3). Наиболее эффективно ингибировал протеиназы I и II соевый ингибитор трипсина в соотношениях фермент : ингибитор, равных 1 : 10 и 1 : 100. Небольшое ингибирующее действие на протеиназу I оказывали ТФХК (ингибитор химотрипсиновых протеиназ) и ФМСФ (ингибитор сериновых протеиназ), а протеиназа II только частично ингибировалась ФМСФ. Протеиназа III ингибировалась соевым ингибитором трипсина и ФМСФ в соотношениях 1 : 10 и 1 : 100. Протеиназы также незначительно ингибировались п-ХМБ, взаимодействующим с тиоловыми группами (табл. 3). Таким образом, можно предположить, что протеиназы *S. strictum* 203 являются трипсиноподобными тиолзависимыми протеиназами серинового типа.

Изучение pH стабильности протеиназ, входящих в состав комплексного препарата, полученного из КЖ микромицета *S. strictum* 203, показало, что активность протеиназы I наиболее эффективно проявлялась в области щелочных pH (рис. 4), в то время как протеиназы II и III сохраняли высокую активность при нейтральном pH. Активность всех трех протеиназ подавлялась при низких (до 5.0) и высоких (с 11.0) pH. Оптимум pH для протеиназы I находился ~10.0, протеиназа II

Таблица 2. Фибринолитическая, фибриногенолитическая и активирующая плазминоген активность протеиназ *S. strictum* 203

Активность	Значение активности		
	протеиназа I	протеиназа II	протеиназа III
Фибринолитическая, усл. ед./мг	193.6	169.8	653.0
Активаторная к плазминогену, усл. ед./мг	443.7	414.2	676.4
Фибринолитическая, $E_{Тир}$/мг	40.8	30.4	191.6
Фибриногенолитическая, $E_{Тир}$/мг	32.6	34.6	217.7

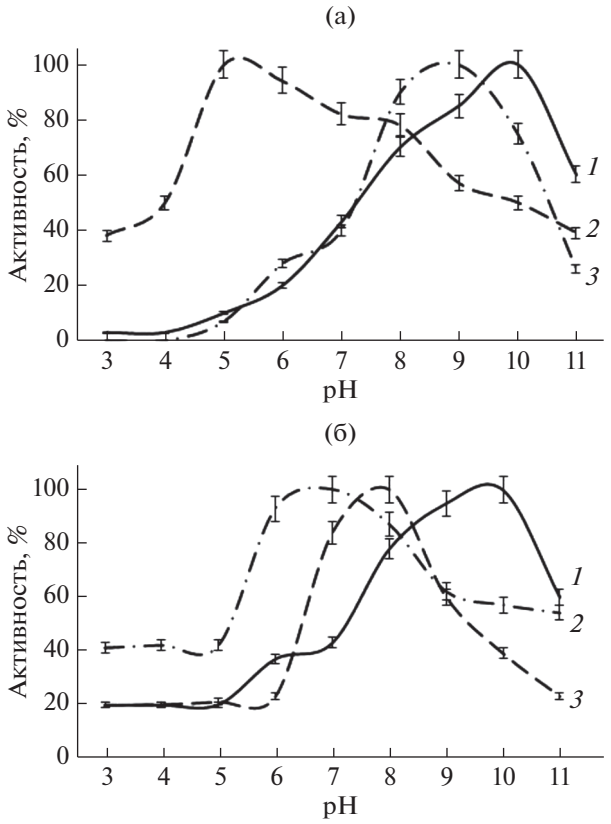

Рис. 4. Влияние pH на активность (а) и стабильность (б) протеиназы I (*1*), II (*2*) и III (*3*) *S. strictum* 203.

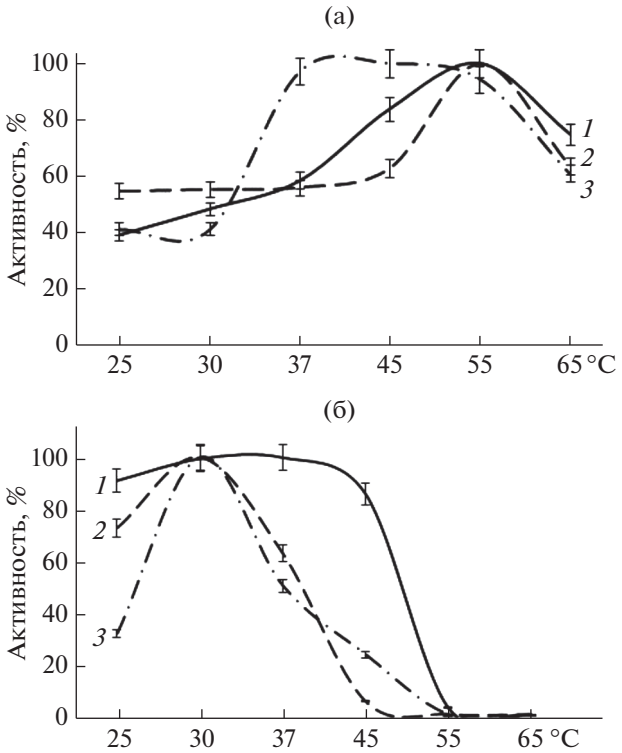

Рис. 5. Влияние температуры на активность (а) и стабильность (б) протеиназы I (*1*), II (*2*) и III (*3*) *S. strictum* 203.

проявляла одинаково высокую активность в диапазоне pH от 5 до 8, оптимум pH для протеиназы III находился ~8 (рис. 3). Из полученных результатов следовало, что оптимальный pH для действия препарата ферментов нейтральный и слабо щелочной. Такие условия проявления активности ферментов совпадали со значением pH крови человека и предполагают возможность ис-

Таблица 3. Ингибиторный анализ внеклеточных протеиназ *S. strictum* 203

Ингибитор	Молярное соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %		
		протеиназа I	протеиназа II	протеиназа III
Контроль (без ингибитора)	–	100.0	100.0	100.0
ЭДТА	1 : 10	72.0	100.0	100.0
	1 : 100	78.0	92.3	100.0
o-Фенантролин	1 : 10	89.3	100.0	100.0
	1 : 100	90.8	100.0	100.0
n-ХМБ	1 : 10	88.9	98.1	97.2
	1 : 100	90.2	98.9	73.6
ФМСФ	1 : 10	72.0	79.1	39.6
	1 : 100	60.0	53.9	32.2
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	0.0	7.3	52.2
	1 : 100	0.0	5.1	60.0
ТФХК	1 : 10	83.6	100.0	100.0
	1 : 100	80.0	100.0	84.6
ТЛХК	1 : 10	80.0	92.1	90.3
	1 : 100	57.8	100.0	90.1

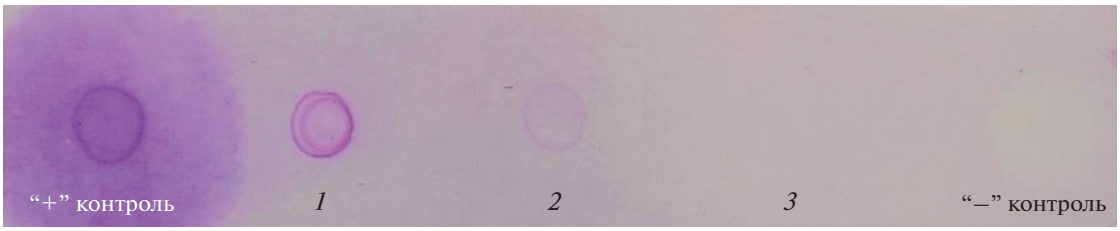

Рис. 6. Определение углеводного компонента в молекулах протеиназ I (*1*), II (*2*) и III (*3*), синтезируемых *S. strictum* 203, а также инвертазы дрожжей ("+", положительный контроль) и БСА ("–", отрицательный контроль).

пользования в дальнейшем препарата в клинике в качестве тромболитика.

В результате изучения термостабильности протеиназ микромицета было показано, что протеиназа I проявляла высокую урокиназную активность и была стабильна в течение 3 ч инкубации при 30 и 37°C (рис. 5). Протеиназы II и III проявляли высокую активность после инкубации при 30°C, а после 3 ч инкубации при 55°C все протеиназы инактивировались. Температурный оптимум действия протеиназ I и II составлял 55°C (рис. 4). Протеиназа III была одинаково активна в диапазоне 37–55°C.

Определение методом дот-блоттинга содержания гликопротеинов реактивом Шиффа в протеиназах, синтезируемых *S. strictum* 203, показало, что они различались по уровню гликозилирования. На рис. 6 видно, что наиболее гликозилированной оказалась протеиназа I, чуть меньше – протеиназа II. В составе протеиназы III гликозидные компоненты не были обнаружены.

Для изучения способности протеиназ продуцента к тромболизису был изучен гидролиз свежеобразованных тромбов плазмы крови *in vitro*. Как видно на рис. 7, протеиназа III вносила наибольший вклад в тромболитический потенциал препарата. Так, масса нелизированного тромба после инкубации с ним в течение 90 мин составила 42.9%. Протеиназы I и II вносили меньший вклад в тромболизис, а масса нелизированного тромба при их использовании в течение того же времени составила 58.0 и 63.2% соответственно.

Таким образом, установлено, что комплекс внеклеточных протеолитических ферментов *S. strictum* 203, обладающий тромболитической активностью, представлен тремя щелочными трипсиноподобными тиолзависимыми протеиназами серинового типа с разными изоэлектрическими точками, но близкими значениями молекулярных масс (около 35 кДа). Одна из протеиназ (протеиназа III) оказалась негликозилировановым белком, остальные были гликопротеинами. Спектр протеолитической активности по отношению к белкам – компонентам тромба также оказался различен. Так, протеиназа I обладала более узкой субстратной специфичностью с выраженной урокиназной активностью и невысокой фибрино- и фибриногенолитической активностью, а протеиназа III проявляла широкую субстратную специфичность. Предположено, что урокиназная активность протеаз обусловливала активирующее плазминоген действие. Комплекс ферментов может найти применение в медицинской практике в качестве тромболитического агента.

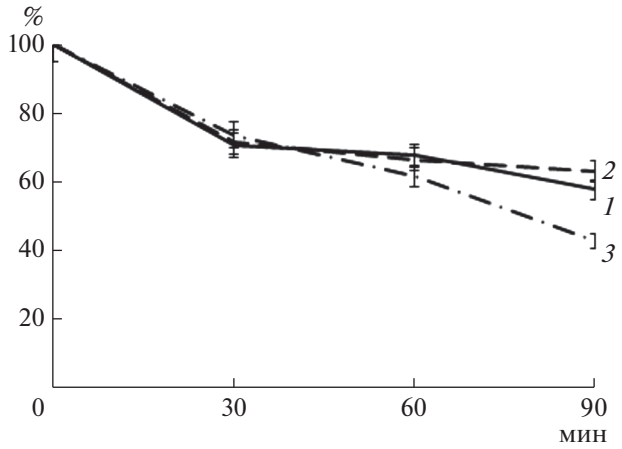

Рис. 7. Лизис тромба (остаточная масса, %) протеиназами I (*1*), II (*2*) и III (*3*), синтезируемыми *S. strictum* 203.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bond J.S.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. № 5. P. 1643–1651.
2. *Rani K., Rana R., Datt. S.* // Int. J. Curr. Life Sci. 2012. V. 2. № 1. P. 12–18.
3. *Kango N., Jana U.K., Choukade R.* Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology // Eds. T. Satyanarayana, S. Deshmukh, M. Deshpande Singapore : Springer, 2019. P. 515–538.
4. *Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 316–322.
5. *Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M.* // Biologia. 2015. V. 70. № 12. P. 1565–1574.
6. *Шамрайчук И.Л., Лавренова В.Н., Белозерский М.А., Кураков А.В., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е.* // Ми-

кология и фитопатология. 2016. Т. 50. № 4. С. 250–256.
7. *Semenova T.A., Dunaevsky Y.E., Beljakova G.A., Belozersky M.A.* // Fung. Biol. 2020. V. 124. № 1. P. 65–72.
8. *Yike I.* // Mycopathologia. 2011. V. 171. № 5. P. 299–323.
9. *Yadav S.*, Siddalingeshwara K.G. // J. Drug Deliv. Therap. 2015. V. 5. № 6. P. 60–62.
10. *Aradhye P.K., Chavan M.D.* // World J. Pharm. Pharm. Sci. 2015. V. 9. № 9. P. 843–851.
11. *Осмоловский А.А., Рукавицына Е.Д., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 504–509.
12. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 373–379.
13. *Shirasaka N., Naitou M., Okamura K., Kusuda M., Fukuta Y., Terashita T.* // Mycoscience. 2012. V. 53. № 5. P. 354–364.
14. *Шаркова Т.С., Корниенко Е.И., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 2. С. 171–176.
15. *Nascimento T.P., Sales A.E., Porto C.S., Brandão R.M.P., Takaki G.M.C., Teixeira J.A., Porto T.S., Porto A.L.F.* // Adv. Enzyme Res. 2015. V. 3. № 3. P. 81-91.
16. *Nascimento T.P., Sales A.E., Porto T.S., Brandão Costa R.M.P., Breydo L., Uversky V.N., Porto A.L.F., Converti A.* // Bioprocess. Biosyst. Eng. 2017. V. 40. № 8. P. 1209–1219.
17. *Deng Y., Liu X., Katrolia P., Kopparapu N.K., Zheng X.* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 109. № 1. P. 1338–1343.
18. *Kim H.C., Choi B.-S., Sapkota K., Kim S., Lee H.J., Yoo J.C., Kim S.-J.* // Process Biochem. 2011. V. 46. № 8. P. 1545–1553.
19. *Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Осмоловский А.А.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2020. Т. 75. № 1. С. 37–42.
20. *Корниенко Е.И., Кокаева Л.Ю., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А.* // Микология и фитопатология. 2020. Т. 54. № 3. С. 206–213.
21. *Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 38–43.
22. *Collen D., Lijnen R.H.* // Thromb. Haemost. 2005. V. 93. № 4. P. 627–630.
23. *Vesterberg O.* // Methods in Enzymology. 1971. V. 22. P. 389–412.
24. *Laemly U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
25. *Holbrook I.B., Leaver A.G.* // Anal. Biochem. 1976. V. 75. № 2. P. 634–636.
26. *Gertler A., Trop M.* // Eur. J. Biochem. 1971. V. 19. № 1. P. 90–96.
27. *Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2016. № 1. С. 71–75.
28. *Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
29. *Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С.* // Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
30. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
31. *Summerbell R.C., Gueidan C., Schroers H.-J., de Hoog G.S., Starink M., Arocha Rosete Y., Guarro J., Scott J.A.* // Stud. Mycol. 2011. V. 68. № 1. P. 139–162.
32. *Kunert J.* // Mycoses. 2001. V. 43. № 7–8. P. 307–310.

Characteristics and Properties of the Complex of Proteolytic Enzymes of the Thrombolytic Action of the Micromycete *Sarocladium strictum*

E. I. Kornienko[a], A. A. Osmolovskiy[a, *], V. G. Kreyer[a], N. A. Baranova[a], I. B. Kotova[a], and N. S. Egorov[b]

[a] *Biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

[b] *International Biotechnological Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

**e-mail: aosmol@mail.ru*

The preparation of thrombolytic enzymes of micromycete *S. strictum* 203 was obtained and characterized. The expressed urokinase activity of producer proteinases was found and the content of the complex of three alkaline trypsin-like thiol-dependent serine-type proteinases with different isoelectric points (4.5, 7.2 and 11.8) but close molecular weight was detected in the enzyme preparation (about 35 kDa). One of the proteinases (proteinase III) was not glycosylated, the rest were glycoproteins. Proteinases differed in the spectrum of proteolytic activity in relation to proteins – the components of the thrombus also turned out to be different. It was suggested that the urokinase activity of enzymes causes plasminogen activating action.

Keywords: micromycete proteinases, fibrinolytic activity, thrombolytic enzymes, plasminogen activators

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 54–58

УДК 577.151.32

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАДФ$^+$-ЗАВИСИМОЙ ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩЕЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ

© 2021 г. А. Т. Епринцев[1], *, М. О. Гатауллина[1]

[1]*Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006 Россия*

**e-mail: bc366@bio.vsu.ru*

Поступила в редакцию 27.01.2020 г.
После доработки 15.05.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

В мезофилле листьев кукурузы была обнаружена одна изоформа НАДФ$^+$-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.40). Очистка фермента осуществлялась в четыре этапа и включала в себя гомогенизацию, фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-Sephacel. Удельная активность очищенного электрофоретически гомогенного препарата составляла 92 Е/мг белка, выход – 15%, а степень очистки – 109. Относительная электрофоретическая подвижность декарбоксилирующей малатдегидрогеназы – 0.1, оптимум pH при катализе прямой и обратной реакций – 8.0. Определены значения констант Михаэлиса для прямой и обратной реакции, которые составили по малату – 5.5 мМ и пирувату – 1.3 мМ. При этом сродство к коферментам значительно различалось. Так, $K_м$ по НАДФ$^+$ равнялась 4.5 мМ, а по НАДФН – 0.9 мМ.

Ключевые слова: НАДФ$^+$-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа, *Zea mays*, очистка, константа Михаэлиса, субъединица, кинетика

DOI: 10.31857/S0555109921010232

Декарбоксилирующая малатдегидрогеназа – малик-энзим (**НАДФ$^+$-МЭ**, КФ 1.1.1.40), является одним из важнейших ферментов, метаболизирующих малат, который важен для стабилизации величины цитоплазматического pH, контроля апертуры устьиц и повышения устойчивости к избытку алюминия и патогенам [1–3]. Другой продукт реакции НАДФ$^+$-МЭ – пируват, участвует в синтезе таких защитных соединений, как флавоноиды и лигнин, которые определяют устойчивость к таким стрессам, как механическое повреждение и проникновение патогенов. Фермент обеспечивает также необходимым восстановительным коферментом НАДФН при биосинтезе флавоноидов и лигнина [4]. НАДФН имеет решающее значение для таких систем метаболизма активных форм кислорода (**АФК**), как путь аскорбат-глутатиона и НАДФ$^+$-зависимой тиоредоксинредуктазы, он также необходим для процессов окисления при защите от микроорганизмов [5].

НАДФ$^+$-МЭ экспрессируется небольшим количеством генов. Так, например, для кукурузы и гороха был описан всего один ген НАДФ-МЭ. По данным базы данных NCBI для арабидопсиса он также кодируется всего одним геном.

У млекопитающих были идентифицированы три изоформы: цитозольный НАДФ$^+$-МЭ, митохондриальный НАДФ$^+$-МЭ и митохондриальный НАД(Ф)$^+$-МЭ, который имеет двойную специфичность, проявляющуюся при использовании в качестве кофермента НАД$^+$ и НАДФ$^+$, однако при нормальных условиях этот фермент предпочитает использовать кофермент НАД$^+$ [6].

Цель работы – получение гомогенного препарата НАДФ$^+$-МЭ и изучение его кинетических и регуляторных свойств.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили 10-суточные проростки кукурузы (*Zea mays* L., сорт Воронежская 76), выращенные гидропонным способом при 25°C. Для выделения мезофильной ткани листья кукурузы (2 г) гомогенизировали в 10 мл 0.1 М трис-HCl буфера, pH 6.5, содержащего 0.01 М $MnCl_2$, 0.04 М ДТТ и 0.04 М ЭДТА. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант представлял собой мезофилл [7].

Активность МЭ в прямой и обратной реакции определяли спектрофотометрически на СФ-2000

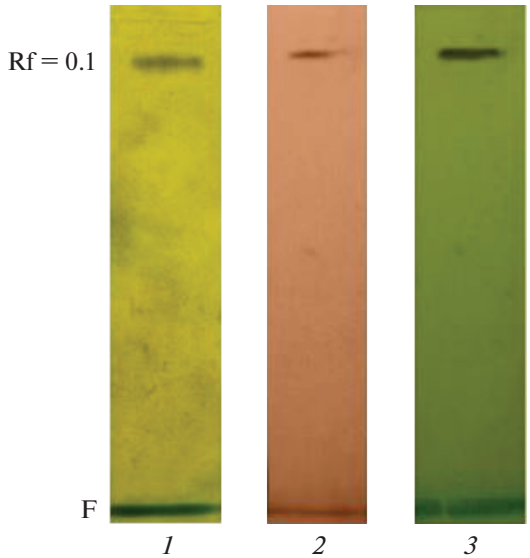

Рис. 1. Электрофорез в ПААГ НАДФ$^+$-МЭ из гомогената мезофилла листьев кукурузы (*1*), очищенного препарата НАДФ-МЭ, окрашенного нитратом серебра (*2*) и очищенного препарата НАДФ-МЭ, окрашенного тетразолиевым методом (*3*).

("Ломо", Россия) по изменению оптической плотности реакционной смеси при 340 нм, свидетельствующей о скорости образования или расходования НАДФН [8, 9]. Определение скорости восстановления пирувата осуществляли в среде, содержащей 100 мМ трис-HCl буфер, pH 6.5, 1.5 мМ пируват и 0.15 мМ НАДФН. Измерение активности фермента в прямой реакции проводили в реакционной среде следующего состава: 100 мМ трис-HCl буфер, pH 6.5, 4 мМ малат и 1 мМ НАДФ$^+$. В качестве кофермента использовали 5 мМ $MnCl_2$. За единицу ферментативной активности НАДФ$^+$-МЭ принимали количество фермента, которое превращало (для обратной реакции) или образовывало (для прямой реакции) 1 мкМ НАДФН за 1 мин при 25°C.

Влияние оксиредуцирующих дегидрогеназ уменьшали понижением pH среды выделения и определения активности фермента (pH 6.5) и использования $MnCl_2$.

Очистка изоформ фермента на первом этапе включала осаждение белковой фракции супернатанта (мезофилла) сульфатом аммония от 35 до 85% насыщения. Полученный осадок растворяли в 100 мМ трис-HCl буфера, pH 6.5, и для освобождения от низкомолекулярных примесей наносили на колонку (1.5 × 20 см) с сефадексом G-25 ("Pharmacia", Швеция), уравновешенную тем же буфером. Собранные фракции (1.5 мл), содержащие фермент, наносили на колонку (1.5 × 12 см) с ДЭАЭ-Sephacel ("GE Healthcare", Швеция), уравновешенную 100 мМ трис-HCl буфером, pH 6.5. Элюцию связавшихся с сорбентом белков проводили линейным градиентом NaCl от 50 до 150 мМ в том же буфере [10, 11].

Электрофорез в 7%-ном полиакриламидном геле (**ПААГ**) проводили по методу, описанному в работах [12, 13]. На дорожку наносили не более 120 мкг белка.

Специфическое проявление активности малатдегидрогеназы на геле осуществляли тетразолиевым методом [14, 15]. Гели инкубировали в 15 мл 0.1 М трис-HCl-буфера, pH 6.5, содержащем 0.2 мл 2 М малата натрия, 18 мг НАДФ$^+$, 10 мг нитросинего тетразолия, предварительно растворенного в 0.5 мл этиленгликоля, и 0.6 мг феназинметасульфата (**ФМС**). Локализацию фермента устанавливали по накоплению диформазана.

Гели, на которые наносили 5–7 мкг белка, были также окрашены нитратом серебра [16–18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении электрофореза в ПААГ в мезофилле листьев кукурузы была обнаружена только одна изоформа НАДФ$^+$-МЭ с относительной электрофоретической подвижностью 0.1 (рис. 1). Активность данного фермента определялась в цитоплазматической фракции мезофилла листьев кукурузы и составляла 98–99% от его общей активности в клетке. Это указывало на субклеточную локализацию НАДФ$^+$-МЭ в цитоплазме.

Для получения высокоочищенных препаратов НАДФ$^+$-МЭ использовали многостадийную схему очистки, результаты которой представлены в табл. 1. При осаждении сульфатом аммония на-

Таблица 1. Очистка НАДФ$^+$-зависимого малик-энзима ($n = 4$; $p \leq 0.05$).

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	17	39.1	46.5	0.8	1	100
Фракционирование сульфатом аммония	2	17.6	5.5	3.2	3.8	44
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	6	14.5	5.3	2.7	3.2	37
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel	4	5.8	0.063	92	109	15

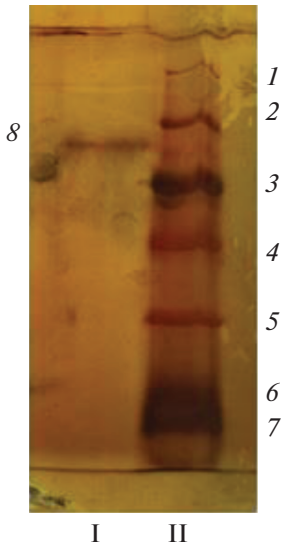

Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na НАДФ-МЭ (I) из мезофилла листьев кукурузы (*8*) и белки-маркеры (II) молекулярной массы: β-галактозидаза – 116 кДа (*1*), БСА– 66.2 кДа (*2*), овальбумин – 45 кДа (*3*), лактатдегидрогеназа – 35 кДа (*4*), рестриктаза Bsp98I – 25 кДа (*5*), β-лактоглобулин– 8.4 кДа (*6*), лизоцим – 14.4 кДа (*7*).

блюдалось 8-кратное уменьшение содержания общего белка и значительное ингибирование активности фермента. Однако его удельная активность увеличилась до 3.2 Е/мг белка. При обессоливании на сефадексе G-25 удалялись низкомолекулярные примеси, а также сульфат аммония, оказывающий ингибирующее действие на активность фермента. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel, используемая на 4 стадии очистки, позволила отделить примеси других белков. Фермент, выделенный с выходом 15% и степенью очистки 109, имел удельную активность 93 Е/мг белка (табл. 1).

Электрофоретический анализ полученного препарата НАДФ$^+$-МЭ после проявления нитратом серебра показал присутствие только одного белкового компонента с Rf = 0.1, что свидетельствовало о его гомогенности (рис. 1). После специфического проявления активности НАДФ$^+$-МЭ тетразолиевым методом было установлено, что этот белковый компонент обладал малатдегидрогеназной активностью (декарбоксилирующей).

Для изучения четвертичной структуры белковой молекулы исследуемого фермента использовали метод электрофореза в присутствии денатурирующего агента додецилсульфата натрия (**ДДС-Na**), который позволял выявить присутствие субъединиц белка [19]. Результаты электрофореза в денатурирующих условиях приведены на рис. 2. Молекулярная масса субъединицы равнялась 54 ± 3.2 кДа, молекулярная масса нативной молекулы НАДФ$^+$-МЭ была определена методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 и составила 225 ± 8.4 кДа. Таким образом, можно заключить, что исследуемый фермент (НАДФ$^+$-МЭ) состоял из четырех одинаковых субъединиц, то есть являлся гомотетрамером.

Были изучены каталитические свойства гомогенной НАДФ$^+$-МЭ. Известно, что концентрация субстрата и его сродство с ферментом определяет скорость ферментативной реакции. Исследование процесса восстановления малата высокоочищенной НАДФ$^+$-МЭ позволило доказать, что ферментативная реакция подчиняется закону Михаэлиса-Ментен [14]. Величины констант Михаэлиса для НАДФ$^+$-МЭ, представленные на графиках, составили по малату – 5.5 мМ, НАДФ$^+$ – 4.5 мМ, пирувату – 1.3 мМ и НАДФН – 0.9 мМ (рис. 3 и 4).

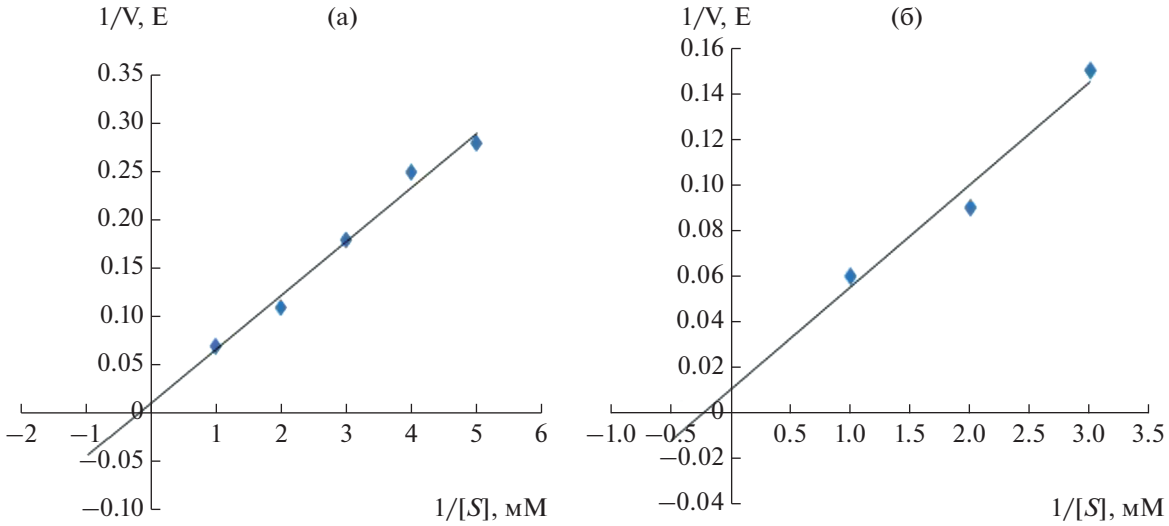

Рис. 3. Определение значения $K_м$ для НАДФ-МЭ в прямой реакции по малату (а) и с НАДФ$^+$(б).

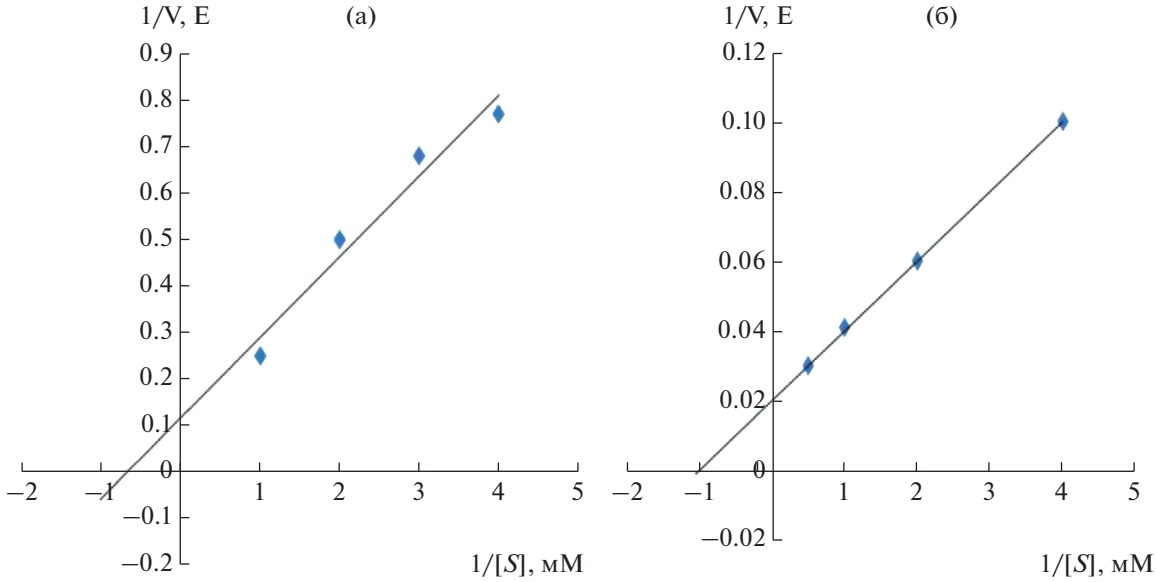

Рис. 4. Определение значения $K_м$ для НАДФ-МЭ в обратной реакции по пирувату (а) и НАДФН (б).

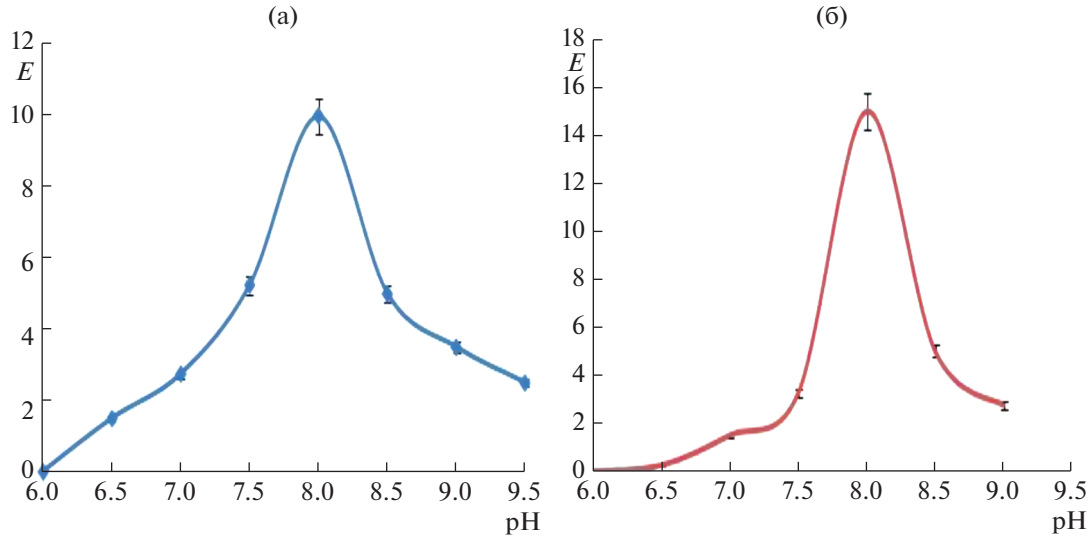

Рис. 5. Зависимость активности НАДФ-МЭ от pH среды в прямой (а) и обратной (б) реакции.

Изучение влияния pH среды на активность НАДФ$^+$-МЭ показало, что оптимум действия фермента в прямой и обратной реакции – pH 8.0 (рис. 5). Следует отметить, что другие формы оксидоредуцирующих малатдегидрогеназ из хлоропластов, пероксисом, митохондрий и цитоплазмы характеризовались оптимальными значениями pH для прямой реакции 9.5, а обратной – 9.0 [20].

Таким образом, использование многостадийной схемы очистки позволило получить электрофоретически гомогенные препараты цитоплазматической декарбоксилирующей малатдегидрогеназы из мезофилла листьев кукурузы. Были исследованы ее физико-химические и каталитические характеристики. Установлено, что фермент представлял собой гомотетрамер, состоящий из четырех одинаковых субъединиц. Обнаружено, что фермент проявлял максимальное сродство по отношению к пировиноградной кислоте. Различные кинетические и каталитические характеристики НАДФ$^+$-МЭ из мезофилла листьев кукурузы свидетельствовали об его участии в катализе различных метаболических процессов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00150).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alfonso S.U., Brüggemann W* // Photosynth. Res.2012. V. 112. № 3. P. 175–191.
2. *Vorapreeda T., Thammarongtham C., Cheevadhanarak S., Laoteng K* // Microbiology. 2013. V. 159. № 12. P. 2548–2557.
3. *Chang G.G., Tong L.* // Biochemistry. 2003. V.42. № 44. P. 12721–12733.
4. *Voll L.M., Zell M.B., Engelsdorf T., Saur A., Gerrard Wheeler M.C., Drincovich M.F., Maurino V.G* // New Phytologist. 2012. V. 195. №. 1. P. 189–202.
5. *Maier A., Zell M.B., Maurino V.G.* //J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 9. P. 3061–3069.
6. *The National Center for Biotechnology Information*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
7. *Popov V.N., Eprintces A.T., Igamberdiev A.U.* // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. № 8. P. 851–857.
8. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U.* // J. plant physiology. 2016. V. 205. P. 33–40.
9. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychina M.A., Igamberdiev A.U.* // Plant Science. 2018. V. 272. P. 157–163.
10. *Епринцев А.Т., Попов В.Н.* Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 1999. 192 с.
11. *Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T.* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1042. https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls. 2016.01042
12. *Davis B.J., Ornstein L.* A New High Resolution Electrophoresis method. N. Y.: Society for the Study at the New York Academy of Medicine, 1959. P. 112–118.
13. *Мауэр Г.* Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. 222 с.
14. *Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Ред. В.И. Розенгарт М.: Мир, 1982. 446 с.
15. *Fieldes M.A.* // Electrophoresis. 1992. V. 13. № 1–2. P. 82–86.
16. *Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J.* // J. Biochem. Biol. 1994. V. 28. № 3. P. 239–242.
17. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
18. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
19. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U.* // J. Plant Physiol. 2018. V. 221. P. 81–84.
20. *Епринцев А.Т., Гатауллина М.О.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 299–303.

Kinetic Properties of NADP$^+$-Dependent Decarboxylating Malate Dehydrogenase from Corn Leaves

A. T. Eprintsev[a], * and M. O. Gataullina[a]

[a]*Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia*

**e-mail: bc366@bio.vsu.ru*

One isoform of NADP$^+$-dependent decarboxylating malate dehydrogenase (EC 1.1.1.40) was found in the leaf mesophyll of corn. The enzyme was purified in four stages and included homogenization, fractionation with ammonium sulfate, gel filtration on Sephadex G-25, and ion exchange – Sephacel. The specific activity of the purified electrophoretically homogeneous preparation was 92 E/mg of protein, while its yield was 15%, and the degree of purification was 109 times. The relative electrophoretic mobility of decarboxylating malate dehydrogenase was 0.1. The optimum pH for the enzyme to function during catalysis of the forward and reverse reactions was 8.0. The K_m were determined for the direct and reverse reactions, which were 5.5 mM for malate and 1.3 mM for pyruvate. Moreover, the affinity for coenzymes varied significantly. So, K_m for NADP$^+$ was equal to 4.5 mM, and K_m for NADPH – 0.9 mM.

Keywords: NADP$^+$-dependent decarboxylating malate dehydrogenase, *Zea mays*, purification of enzyme, Michaelis constant, subunit, kinetics

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 59–67

УДК 579.6. 606

АНТИМИКРОБНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АЛКАЛОФИЛЬНОГО ГРИБА *Sodiomyces alkalinus* И ОТБОР ШТАММОВ – ПРОДУЦЕНТОВ НОВЫХ АНТИМИКОТИКОВ

© 2021 г. А. Е. Куварина[1, *], М. Л. Георгиева[1, 2], Е. А. Рогожин[1, 4], А. Б. Кулько[3], И. А. Гаврюшина[1], В. С. Садыкова[1, **]

[1]*Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия*

[2]*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия*

[3]*Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, 107076 Россия*

[4]*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997 Россия*

**e-mail: nastena.lysenko@mail.ru*

***e-mail: sadykova_09@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.07.2020 г.
После доработки 31.08.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Исследована способность представителей алкалофильных штаммов микромицетов вида *Sodiomyces alkalinus* к продукции антимикробных соединений. В результате определения выхода антибиотических соединений и их спектра из наиболее активных штаммов отобран перспективный продуцент антимикотиков *Sodiomyces alkalinus* штамм 8KS17-10. Продуцент проявлял антифунгальную активность к условно-патогенным грибам и патогенным клиническим изолятам плесневых и дрожжевых грибов – возбудителей системных микозов. Выделенное активное индивидуальное соединение по совокупности выявленных структурных особенностей (молекулярная масса, характер фрагментации при ионизации, соотношение УФ-поглощения на определенных длинах волн) может быть отнесено к группе антимикробных гликопептидов.

Ключевые слова: антимикробные гликопептиды, *Sodiomyces*, алкалофилы, микромицеты, антибиотики

DOI: 10.31857/S0555109921010311

Распространение антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов является одним из общепризнанных глобальных вызовов системе здравоохранения во всех странах. Широкое применение антибиотиков в последние десятилетия привело к тому, что до 30% случаев инфекционных заболеваний не поддается терапии известными препаратами, включая антибиотики последних поколений. Сдерживание экспансии резистентных штаммов, наблюдаемое по всему миру, требует применения комплексных радикальных мер, включающих поиск принципиально новых соединений с антимикробной активностью.

Грибы – одна из основных групп живых организмов, рассматриваемых в качестве продуцентов антибиотиков, тем не менее, к настоящему времени, только небольшая часть из них исследована на предмет синтеза вторичных антимикробных продуктов.

Традиционно грибы, продуцирующие антибиотики, выделяли из образцов почвы. Тем не менее, этот источник, по большей части, исчерпан и на первый план в поиске новых и более эффективных антимикробных соединений выходят нетрадиционные биотопы с недавно открытыми организмами [1]. Эти биотопы включают в себя засушливые почвы, пещеры, районы с высокими или низкими температурами, высокой соленостью и щёлочностью, глубины морей и океанов и т.д. Выживание в таких условиях связано с синтезом различных метаболитов, имеющих отличную, от ранее исследованных, структуру. За прошедшие 10–15 лет было выделено и охарактеризовано более 20000 таких соединений, продуцируемых экстремофильными микроорганизмами [2, 3]. Несмотря на сложности обнаружения и культивирования грибов-экстремофилов, в частности, алкалофильных грибов, проводимые скрининговые исследования показывают их огромный потенциал в качестве источников новых биоактивных соединений [4].

Так, у алкалотолерантного гриба *Paecilomyces lilacinus* показан синтез пептидных антибиотиков 1907-II и 1907-VIII с антибактериальной и антифунгальной активностями [5]. Алкалофильный гриб *Aspergillus flavus* продуцирует койевую кислоту и фомалигол А, обладающие активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [6, 7]. У штаммов алкалофильного гриба *Emericellopsis alkalina*, выделенных из щелочных засоленных почв, обнаружен и описан новый липопептаибол – эмерициллипсин А, обладающий антифунгальной, антибактериальной, в том числе и по отношению к грамотрицательным бактериям, а также противоопухолевой активностями [8].

Большинство известных к настоящему времени алкалофильных и алкалотолерантных таксонов грибов принадлежит к аскомицетам из семейства Plectosphaerellaceae. Особенно интересны представители недавно описанного рода *Sodiomyces* (Ascomycota, Plectosphaerellaceae), для которых подтверждён облигатно-алкалофильный тип адаптации. Виды этого рода служат моделями в исследованиях экофизиологии грибов, изучении биохимических основ адаптации к фактору pH [9, 10], переносе бактериальных генов в геном грибов и эволюции ферментов [11]. Показано, что в геноме *S. alkalinus* есть последовательности, кодирующие основные ферменты, необходимые для биосинтеза бета-лактамных антибиотиков. При этом известно, что бета-лактамы быстро разлагаются при высоком pH [12, 13]. Остается открытым вопрос, синтезирует ли эти вещества гриб в природных условиях, где высоко разнообразие различных групп прокариот, а также обильно представлены некоторые щелочеустойчивые грибы, или в щелочных условиях продуцирует другие антимикробные соединения [11].

Цель работы – оценка антимикробной активности алкалофильных изолятов вида *Sodiomyces alkalinus*, отбор продуцентов пептидных антибиотиков и идентификация наиболее активных из них.

МЕТОДИКА

Объектами исследования были 25 алкалофильных штаммов недавно описанного вида *Sodiomyces alkalinus* (Bilanenko & M.Ivanova) A.A. Grum-Grzhim., A.J.M. Debets & Bilanenko (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Sodiomyces+alkalinus), выделенного из щелочных засоленных почв в различных географических регионах [14]. Культуры получены из коллекции “Грибы экстремальных местообитаний” кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Россия). Часть изолятов депонирована во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, Пущино, Россия) и Центре биоразнообразия грибов (CBS, Fungal Biodiversity Centre, Утрехт, Нидерланды). Штамм F11 (= CBS 110278 = = VKM F-3762), используемый в работе, является типовым для этого вида, и его полный геном аннотирован [11].

На первых этапах работы антимикробную активность штаммов оценивали методом диффузии в агар на тест-культурах условно-патогенных микроорганизмов *Aspergillus niger* INA 00760 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Высокоактивными считали культуры, у которых зона задержки роста тест-организма составляла 25 мм и более, умеренно активными культурами считались с зоной задержки роста 10–25 мм и слабоактивными с зоной менее 10 мм.

Способность к синтезу антимикробных веществ оценивали при выращивании на специализированной щелочной среде, которая, по полученным ранее данным, является оптимальной для роста и развития этого микромицета [11, 14].

Для отобранных 8 штаммов исследовали образование антимикробных веществ при культивировании в жидкой щелочной среде следующего состава (г/л): Na_2CO_3 – 24; $NaHCO_3$ – 12; NaCl – 6; KNO_3 – 1; K_2HPO_4 – 1, солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 200 мл; дрожжевой экстракт – 1; дистиллированная вода – 800 мл [15]. Грибы выращивали стационарно в колбах на 500 мл в течение 14 сут. После окончания выращивания культуральную жидкость отделяли фильтрацией через мембранные фильтры на воронке Зейца под вакуумом.

Для трех штаммов было проведено сравнение антимикробной активности при различных способах хранения культур. Сравнивали одинаковые штаммы, одни из которых хранились в глицерине при –70°C в кельвинаторе, другие – на агаризованной щелочной среде в пробирках в холодильнике при 6°C. Оба варианта хранили в указанных условиях не менее 2 лет.

Для выделения антибиотических веществ культуральную жидкость (**КЖ**) продуцента экстрагировали этилацетатом в соотношении органический растворитель–КЖ 5 : 1. Полученные экстракты упаривали в вакууме на роторном испарителе Rotavapor-RBuchi (“Büchi”, Швейцария) при 42°C досуха, сухой остаток растворяли в водном 70%-ном этаноле и получали спиртовые концентраты.

Антимикробную активность определяли в исходной КЖ, в спиртовых концентратах экстрактов КЖ и мицелия, на стерильных бумажных дисках (бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76, Россия), смоченных в экстрактах и высушенных в стерильных условиях. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В для грибов 40 мкг/диск, и ампициллином для бактерий 10 мкг/диск (“НИИ Пастера”, Россия).

Спектр антимикробной активности культуральной жидкости, экстрактов и индивидуальных соединений определяли на тест-культурах мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов и бактерий из коллекции культур Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (Москва, Россия). Использовали условно-патогенные плесневые и дрожжевые тест-культуры грибов видов *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37, *A. niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, тест-культуры штаммов грамположительных – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* FDA 209P и грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli* ATCC 25922.

Спектр антимикотического действия антимикробного пептида также оценивали на клинических изолятах плесневых и дрожжевых грибов – возбудителей оппортунистических пневмомикозов бронхов и легких у больных туберкулезом, обладающих мультирезистентностью по отношению к применяемым в клинической практике антибиотикам-азолам, из коллекции микологической лаборатории "Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом" (Россия): *Candida albicans* 1582м 2016, *C. glabrata* 1402м 2016, *C. krusei* 1447м 2016, *C. parapsilopsis* 571м, *C. tropicalis* 156м 2017, *Cryptococcus neoformans* 297м 2017, *Aspergillus fumigatus* 390м, *A. niger* 219.

Дальнейшее разделение активных фракций (после экстракции) проводили путем аналитической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ОФ-ВЭЖХ**) с использованием аналитической колонки XBridge 5 мкм 130 A размером 250 × 4.6 мм ("Waters", Ирландия) в растущем линейном градиенте концентрации ацетонитрила в качестве подвижной фазы (элюент A – 0.1%-ная трифторуксусная кислота (**ТФУ**) в воде MQ, элюент B – 80%-ный ацетонитрил в 0.1%-ной водной ТФУ) при скорости потока 950 мкл/мин. Для ОФ-ВЭЖХ использовали ультраградиентный ацетонитрил фирмы ("Panreac", Испания) и ТФУ производства "Sigma-Aldrich" (США). Детектирование разделяемых веществ осуществляли при длине волны 214 нм в градиенте концентрации элюента B: 16–28% – за 12 мин; 28–55% – за 27 мин; 55–75% – за 20 мин и 75–85% – за 10 мин с последующим изократическим элюированием в течение 25 мин. С целью масштабирования получения индивидуальных компонентов спиртового концентрата экстракта культуральной жидкости продуцента было проведено его аналогичное разделение методом полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке XBridge 10 мкм 130 A (250 × 10 мм). Поглощение (D) определяли при длине волны 214 нм и скорости потока подвижной фазы 4.4 мл/мин. Полученные в ходе ОФ-ВЭЖХ фракции, соответствующие отдельным пикам, были собраны вручную, затем избыток органического растворителя (ацетонитрила) удаляли упариванием на вакуумной центрифуге SpeedVac ("Savant", США) и лиофилизовали ("Labconco", США) для удаления остаточных количеств ТФУ. Спектр антимикробного действия веществ, содержащихся во фракциях, определяли диско-диффузионным методом, как описано выше.

Молекулярные массы активных соединений в выделенной фракции устанавливали на MALDI времяпролетном масс-спектрометре AutoSpeed MALDI TOF/TOF ("BrukerDaltonics", Германия), оснащенном УФ лазером 355 нм (Nd : YAG) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. На мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 1 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты концентрацией 10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле с 0.5%-ной ТФУ кислотой. Полученную смесь высушивали на воздухе.

Спектры поглощения снимали с использованием спектрофотометра UV-1800 ("Shimadzu", Япония) в кварцевых кюветах на 2 мл с длиной оптического пути 1 см.

Минимальную подавляющую концентрацию (**МПК**) определяли за 24 ч для дрожжевых грибов *C. albicans* и 48 ч – для плесневых *A. niger* и *A. fumigatus*. МПК определяли как минимальную концентрацию вещества, полностью подавляющую рост тест-культуры.

Эксперименты проводили в 3–5 повторностях. Статистическую обработку результатов и оценку достоверности различий средних значений проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95% с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения антимикробной активности штаммов гриба *Sodiomyces alkalinus* использовали щелочную среду на буферной основе. Проведенные ранее исследования особенностей экофизиологии показали, что *S. alkalinus* является облигатным алкалофилом, т.е. не способен к росту при кислых pH среды. При значениях pH среды 6–7 значительно снижается скорость его роста, слабо развито или отсутствует бесполое и половое спороношение, воздушный мицелий слабо выражен, а гифы часто деформированы. Специально разработанная для грибов-алкалофилов щелочная среда позволяла поддерживать высокие значения pH (10.5), тем самым имитируя условия природных щелочных биотопов, из которых были выделены изоляты этого уникального гриба. При культивировании на щелочной среде у штаммов *S. alkalinus* отмечена максимальная скорость роста (по сравнению со средами с кислыми и нейтральными pH) и в полной мере проявлялись все характерные морфолого-культуральные признаки [14].

Таблица 1. Соотношение исследованных штаммов *Sodiomyces alkalinus* с антифунгальной и антибактериальной активностью

Тест-организм	Штаммы *S. alkalinus* (25 штаммов -100%)		
	слабоактивные	умеренно активные	высокоактивные
A. niger INA 00760	12 (52%)	8 (28%)	5 (20%)
B. subtilis ATCC 6633	11 (44%)	11 (44%)	3 (12%)

Таблица 2. Антимикробная активность культуральной жидкости и экстрактов КЖ штаммов *Sodiomyces alkalinus* (в мм зоны подавления роста тест-организмов)

Штамм,№	Зона подавления роста КЖ				Зона подавления роста экстрактами КЖ			
	B. subtilis ATCC 6633	*A. niger* INA 00760	*C. albicans* ATCC 2091	*A. fumigatus* КПБ F-37	*B. subtilis* ATCC 6633	*A. niger* INA 00760	*C. albicans* ATCC 2091	*A. fumigatus* КПБ F-37
5KS17-8	18	14	0	0	0	17	8	8
8KS17-10	33	9	12	0	0	40	9	12
9KS17-1	15	11	0	0	0	12	0	9
11KS17-1	17	12	0	0	13	40	17	12
2KS10-1	23	16	0	0	13	8	0	8
3KS11-1	0	12	12	0	0	9	9	10
1KS13-4	30	13	0	0	25	10	18	8
F11 (типовой)	10	13	0	0	22	18	0	13

При pH среды 8 и 10 оптимальна работа многих ферментов *S. alkalinus* (целлюлазы, гемицеллюлазы, протеазы) [11]. Для изолятов другого алкалофильного гриба (*Emericellopsis alkalina*), также выделенных из биотопов со щелочной средой, ранее было показано, что наибольшая антифунгальная активность у них проявлялась на среде с высоким значением pH [15, 16].

Оценка антимикробной активности 25 штаммов *Sodiomyces alkalinus* в отношении тест-грибов и бактерий показала, что около половины исследованных штаммов обладает умеренной или высокой активностью в отношении *A. niger* INA 00760 и *B. subtilis* ATCC 6633, при этом доля высокоактивных изолятов с антифунгальной активностью составляла 20% (табл. 1). Выявленный антимикробный спектр может быть отражением обитания в природных засоленных биотопах, где массово развиваются многочисленные бактерии, а также обильны несколько видов щелочеустойчивых микромицетов, среди которых в первую очередь стоит отметить *E. alkalina*, изоляты которого также показывают выраженную антифунгальную активность [15, 16].

По результатам первичного скрининга на твердых средах были отобраны 8 активных штаммов *S. alkalinus*, включая типовой штамм (F11) с которыми проводили дальнейшие исследования при культивировании на жидких средах.

Из 8 отобранных штаммов в отношении условно-патогенного гриба *A. niger* INA 00760 и дрожжей *C. albicans* ATCC 2091 значительная антифунгальная активность культуральной жидкости и её экстрактов при росте в жидкой среде выявлена у 4 (5KS17-8, 8KS17-10, 11KS17-1, F11) и 1 (1KS13-4) штамма соответственно (табл. 2). Высокоактивными в отношении грамположительной бактерии *B. subtilis* ATCC 6633 были 2 штамма из 8: 1KS13-4 и F11 (табл. 2) по отношению к грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* FDA 209P и грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922 активности не было выявлено.

Для дальнейшего изучения антибиотического комплекса, проявляющего антифунгальную активность, были отобраны три штамма 8KS17-10, 11KS17-1 и F11, активность этилацетатных экстрактов КЖ которых была выше, чем у амфотерицина B в концентрации 40 мкг/диск. Анализ антибиотической активности у этих штаммов показал, что способ хранения культуры в кельвинаторе при −70°C в глицерине или в холодильнике на агаризованной среде в пробирке при 6°C не оказывал значительного влияния на синтез антибиотиков.

В дальнейшем была разработана схема разделения антибиотического комплекса трех штаммов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В результате был получен сходный профиль компонентов активного концентрата для всех исследуемых штам-

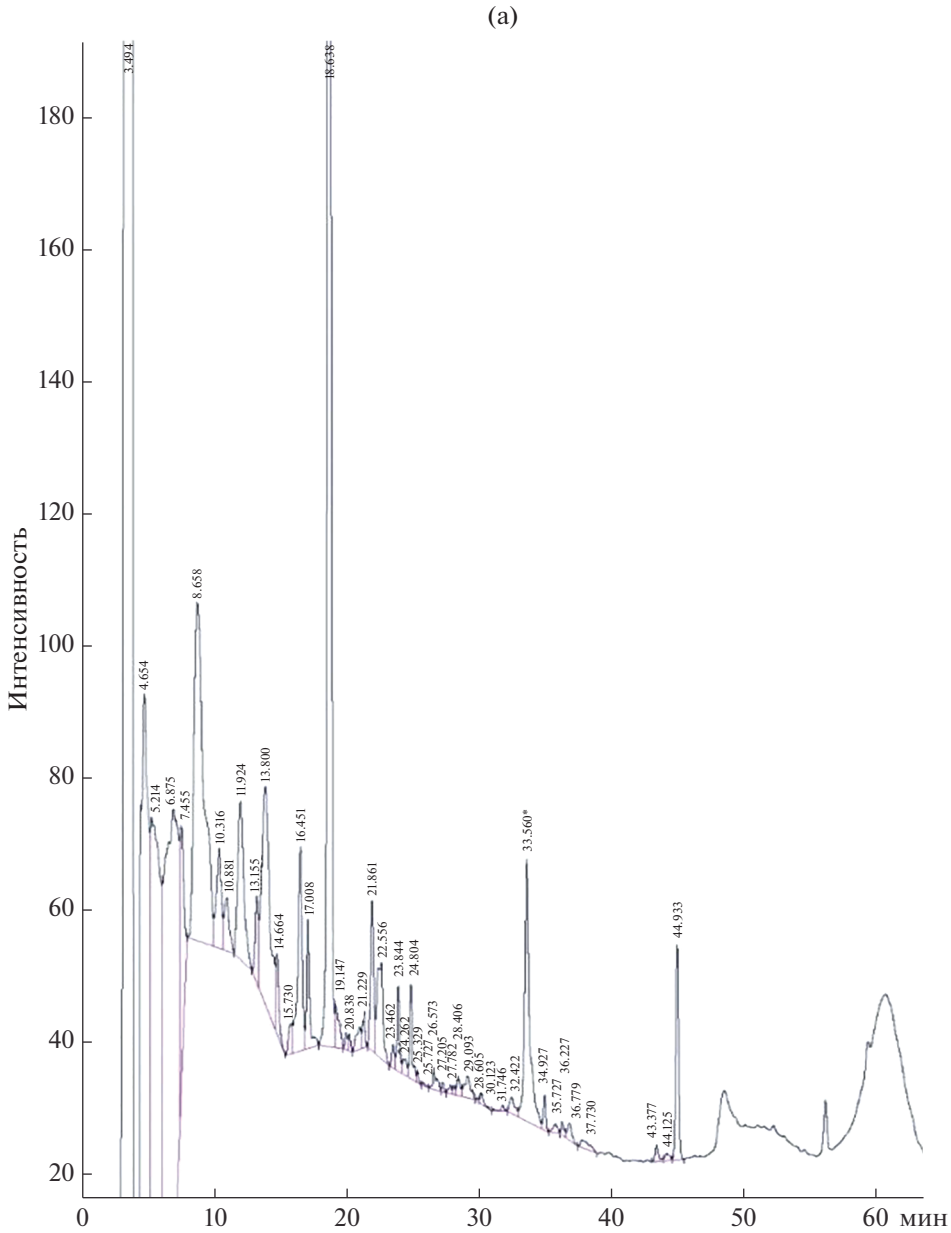

Рис. 1. Профиль аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ экстрактов КЖ трех штаммов *S. alkalinus*: а – 8KS17-10; б – 11KS17-1; в – F11. * – пик Sod 1.

мов, насчитывающий три преобладающие фракции (рис. 1) с различной степенью гидрофобности.

Тестирование полученных основных индивидуальных соединений комплекса на наличие антимикробных свойств позволило выявить выраженную активность лишь у одного преобладающего пика, который элюировался с колонки на 34.2 мин и был назван Sod 1. Зона задержки роста *A. niger* INA 00760 для соединения Sod 1 составила 22 мм.

Для активного соединения был получен спектр поглощения в диапазоне длин волн 210–340 нм, который имеет лишь один характерный максимум в области коротковолнового ультрафиолета (около 205 нм), что свидетельствует о наличии в его структуре пептидных связей (рис. 2). Минимальное поглощение в диапазоне 240–280 нм, что указывает на отсутствие в структуре элементов карбо- и гетероциклической природы (рис. 2).

Для исследования первичной структурной характеристики был проведен МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ активного соединения, который позволил установить среднюю молекулярную массу соединения – 7918.4 Да (рис. 3). Характер распределения сигналов m/z с шагом более чем в 100 Да свидетельствует о фрагментации

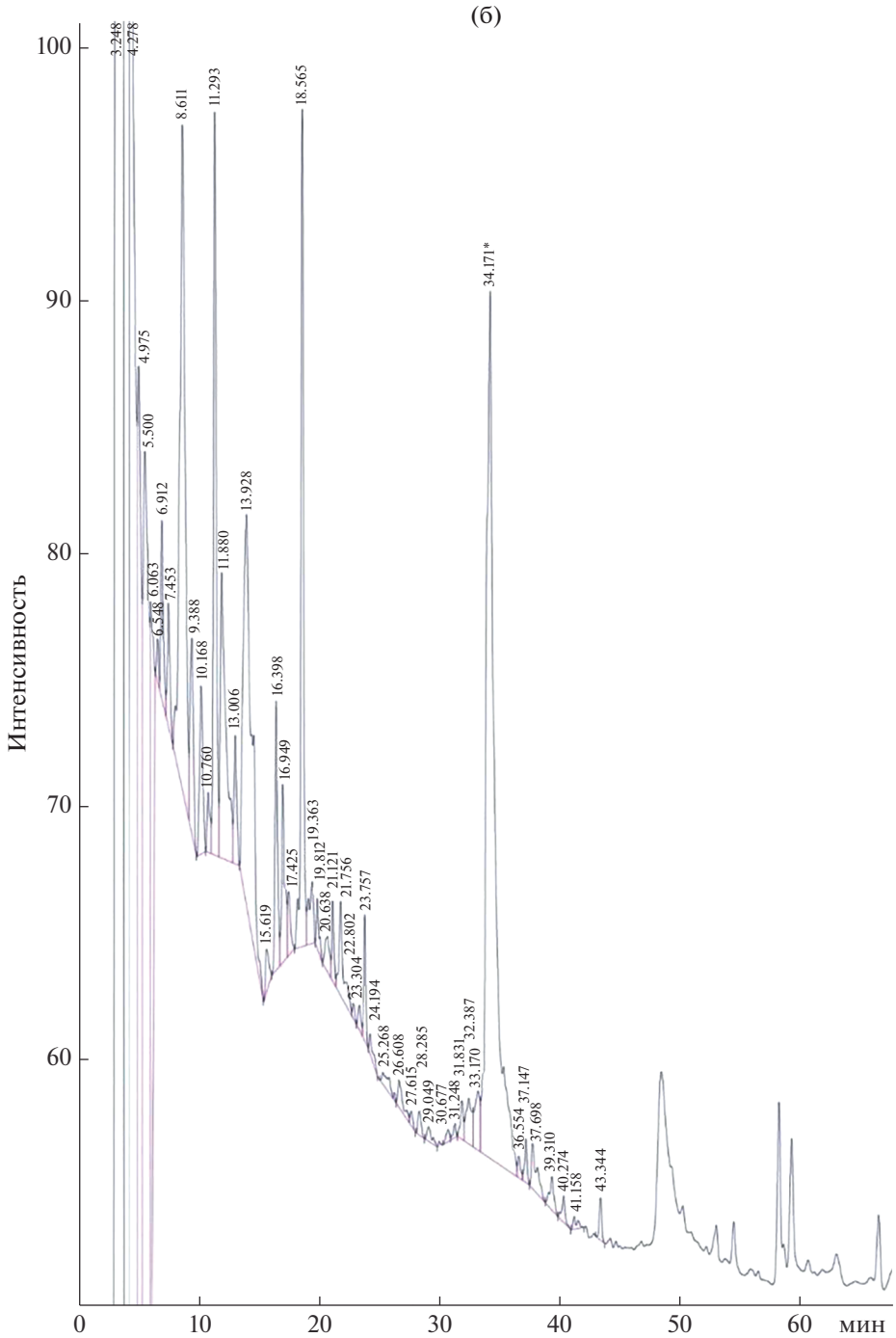

Рис. 1. Продолжение.

молекулы посредством гидролиза гликозидных связей, что определяет разницу в молекулярной массе с агликоном (7586.34 Да) примерно в 332 Да, что предположительно соответствует наличию остатков сахаров.

Для соединения Sod 1 была определена МПК в отношении условно – патогенных плесневых и дрожжевых грибов и бактерий, а также клинических изолятов – возбудителей инвазивных аспергиллезов, кандидемии и криптококкоза (табл. 3).

Установлено, что МПК вещества Sod 1 для *Cryptococcus neoformans* 297м 2017 составляет 1 мкг/мл, а в концентрации 16 мкг/мл он ингибирует *C. albicans* 1582м, *A. niger* 219 и *A. fumigatus* 390 м.

Таким образом, способность к продукции антимикотических соединений с высокой и умерен-

(в)

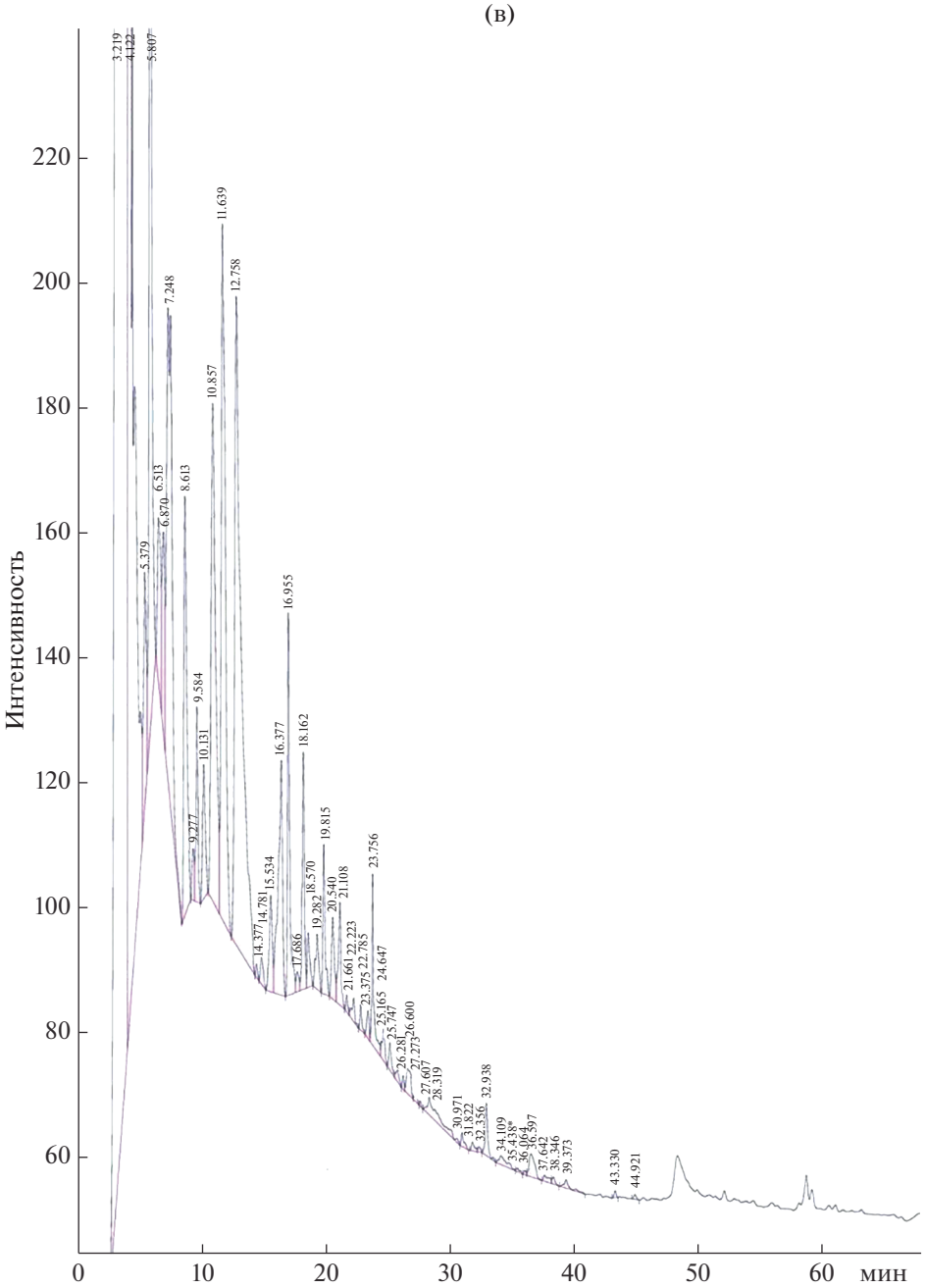

Рис. 1. Окончание.

Таблица 3. Антифунгальная активность соединения Sod 1 в отношении клинических патогенных плесневых и дрожжевых грибов с множественной резистентностью к азолам

Тест-организм	Диаметр зоны подавления, мм			
	Sod 1 (40 мкг/диск)	Амфотерицин B	Флуконазол	Вориконазол
C. albicans 1582 м 2016	18 ± 0.1	10 ± 0.6	0	0
C. glabrata 1402 м 2016	16 ± 0.3	15 ± 0.1	0	0
C. krusei 1447 м 2016	12.5 ± 0.2	0	0	0
C. tropicalis 156 м 2017	14 ± 0.1	0	0	0
C. parapsilosis 571 м	14 ± 0.2	18 ± 0.3	0	0
Cryptococcus neoformans 297 м 2017	30 ± 0.1	18 ± 0.6	0	0
A. fumigatus 390 м	12 ± 0.5	9 ± 0.6	0	0
A. niger 219	14 ± 0.1	15 ± 0.8	0	0

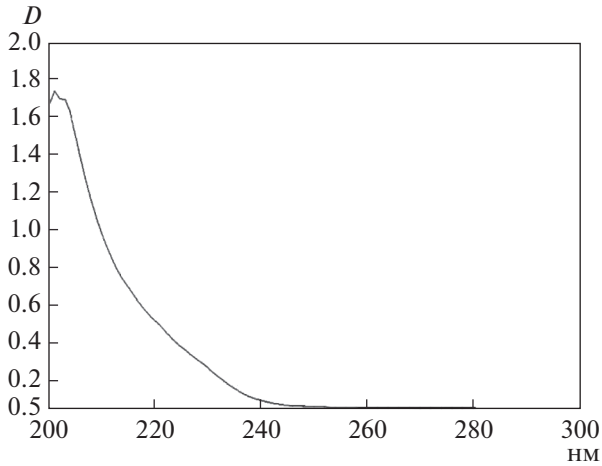

Рис. 2. Профиль УФ-поглощения соединения Sod 1 в диапазоне 200–340 нм.

ной активностью установлена у трети из всех проверенных экстремофильных изолятов *S. alkalinus,* что может свидетельствовать о перспективности поиска продуцентов антимикотиков у представителей этого вида. Предварительно были отобраны три штамма этого вида, проявляющие выраженную антифунгальную активность к дрожжевым грибам, в том числе клиническим изолятам – возбудителям инвазивных микозов, которые могут быть рекомендованы в дальнейшем как продуценты новых перспективных препаратов для лечения тяжелых микозов у онкобольных (предположительно, отсутствие нежелательных явлений и побочных токсических эффектов). Выраженное противогрибковое действие в отношении *C. neoformans* может иметь перспективы также для этиотропной терапии криптококкоза, для которого в терапии сейчас используют амфотерицин B с существенным побочным действием.

Выделенное активное соединение по совокупности выявленных структурных особенностей (молекулярная масса, характер фрагментации при ионизации, соотношение поглощения на определенных длинах волн) может быть предварительно отнесено к группе гликозилированных антимикробных пептидов, обладающих специфичностью действия преимущественно по отношению к грибам-микромицетам. Дальнейшая структур-

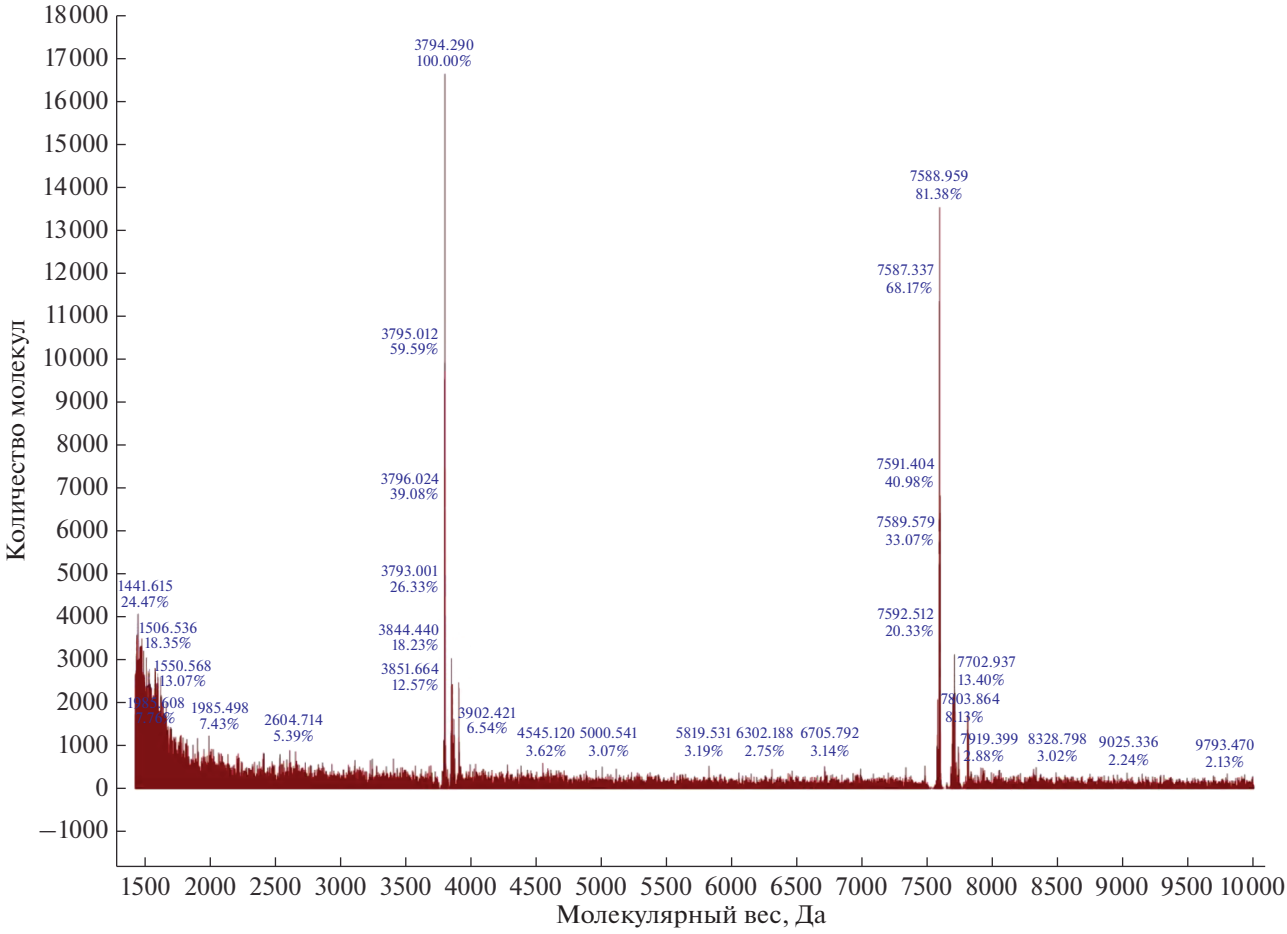

Рис. 3. MALDI-масс-спектрометрический анализ соединения Sod 1.

ная идентификация будет проводиться комбинацией физико-химических методов: масс-спектрометрия высокого разрешения и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Культивирование и идентификация изолятов выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00992 (Георгиева М.Л., Куварина А.Е.). Определение спектра антибиотической активности и МПК индивидуальных соединений при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90088 (Гаврюшина И.А., Садыкова В.С.). ВЭЖХ анализ, выделение индивидуальных метаболитов и первичная структурная характеристика проведена при поддержке проекта РНФ № 18-74-10073 (Рогожин Е.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schmitt E.K., Hoepfner D., Krastel P.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 43. № 2. P. 249–260.
2. *Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A.* // The J. Antibiot. 2017. V. 70. № 1. P. 3–24.
3. *Imhoff J.F.* // Marine Drugs. 2016. V. 14. № 1. P. 19–37.
4. *Ibrar M., Ullah M.W., Manan S., Farooq U., Rafiq M., Hasan F.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. № 7. P. 2777–2801.
5. *Sato M., Beppu T., Arima K.* // Agric. Biol. Chem. 1980. V. 44. № 12. P. 3037–3040.
6. *Wu Y., Shi Y., Zeng L., Pan Y., Huang X., Bian L., Zhu Y., Zhang R., Zhang J.* // Food Science Technology International. 2019. V. 25. № 1. P. 3–15.
7. *Yang G., Sandjo L., Yun K., Leutou A.S., Kim G.-D., Choi H.D., Kang J.S., Hong J., Son B.W.* // Chemical Pharmaceutical Bulletin. 2011. V. 59. № 9. P. 1174–1177.
8. *Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Baranova A.A., Vasilchenko A.S., Lushpa V.A., Mineev K.S., Georgieva M.L., Kulko A.B., Krasheninnikov M.E., Lyundup A.V., Vasilchenko A.V., Andreev Y.A.* // Molecules. 2018. V. 23. № 2785. P. 1–12.
9. *Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M.* // Extremophiles. 2017. V. 21. № 4. P. 743–754.
10. *Бондаренко С.А., Януцевич Е.А., Синицына Н.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н., Терёшина В.М.* // Микробиология. 2018. Т. 87. № 1. С. 12–22.
11. *Grum-Grzhimaylo A.A, Falkoski D.L., van den Heuvel J., Valero-Jiménez C.A., Min B., Choi I.-G., Lipzen A., Daum C.G., Aanen D.K., Tsang A., Henrissat B., Bilanenko E.N.,de Vries R.P., van Kan J.A.L., Grigoriev I.G., Debets A.J.M.* // Mol. Ecol. 2018. V. 27. № 23. P. 4808–4819.
12. *Deshpande G.R., Dhekne V.V., Kulkarni S.B., Biswas S.S., Deo M.D., Ayyangar N.R.* // Hindustan Antibiot. Bull. 1986. V. 28. P. 53–62.
13. *Deshpande A.D., Baheti K.G., Chatterjee N.R.* // Current science. 2004. V. 87. № 12. P. 1684–1695.
14. *Grum-Grzhimaylo A.A., Debets A.J.M., van Diepeningen A.D., Georgieva M.L., Bilanenko E.N.* // Persoonia. 2013. V. 31. P. 147–158.
15. *Baranova A.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Andreev Ya A., Rogozhin E.A., Sadykova V.S.* // App. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 6. P. 703–710.
16. *Baranova A.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Kul'ko A.B., Yakushev A.V., Alferova V.A., Sadykova V.S.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 2. P. 145–151.

Antimicrobial Potential of the Alkalophilic Fungus *Sodiomyces alkalinus* and Selection of Strains – Producers of New Antimicotics

A. E. Kuvarina[a, *], M. L. Georgieva[a, b], E. A. Rogozhin[a, d], A. B. Kulko[c], I. A. Gavryushina[a], and V. S. Sadykova[a, **]

[a] *Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia*

[b] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

[c] *Moscow Municipal Scientific Practical Center of Tuberculosis Control, Health Department of Moscow, Moscow, 107076 Russia*

[d] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: nastena.lysenko@mail.ru*

***e-mail: sadykova_09@mail.ru*

The ability of representatives of alkalophilic micromycetes of the species *Sodiomyces alkalinus* to produce antimicrobial compounds was studied. As a result of determining the spectrum and yield of antibiotic compounds, a promising producer of antimycotics *Sodiomyces alkalinus* was selected from the most active strains. The producer exhibited antifungal activity against opportunistic fungi, as well as pathogenic clinical isolates of molds and yeasts – pathogens of systemic mycoses. The isolated active compound can be attributed to the group of antimicrobial peptides based on the totality of the identified structural features (molecular weight, absorption ratio at certain wavelengths).

Keywords: antimicrobial peptides, *Sodiomyces*, alkalophiles, micromycetes, antibiotics

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 68–76

УДК 663.15

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С УВЕЛИЧЕННОЙ ПЕКТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ НОВОГО МУТАНТНОГО ШТАММА *T. reesei* Co-44

© 2021 г. Е. В. Костылева[1, *], А. С. Середа[1], И. А. Великорецкая[1], А. М. Айсина[1], Н. В. Цурикова[1], Е. А. Рубцова[2], А. Д. Сатрутдинов[2], А. П. Синицын[2, 3]

[1]*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) – филиал ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии", Москва, 111033 Россия*

[2]*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия*

[3]*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: ekostyleva@list.ru*

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.
После доработки 03.07.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Для создания комплексных ферментных препаратов сбалансированного состава, обеспечивающих эффективный гидролиз основных некрахмальных полисахаридов растительного сырья (целлюлозы, ксиланов, пектина) проведены исследования по оптимизации состава ферментационной среды для глубинного культивирования нового мутантного штамма *Trichoderma reesei* Co-44 – высокоактивного продуцента карбогидраз эндодеполимеразного действия. Показано, что концентрат низкомолекулярных веществ сои обеспечивал максимальное – более, чем в 8 раз, увеличение активности полигалактуроназы при увеличенном уровне биосинтеза эндоглюканазы и ксиланазы. Получен комплексный ферментный препарат ксилоризин K4, изучены его физико-химические свойства. С помощью масс-спектрометрического анализа подтверждено присутствие в составе ксилоризина K4 эндополигалактуроназы (GH28) *T. reesei*. Показана перспективность применения ксилоризина K4 для удаления основных некрахмальных полисахаридов соевого шрота в процессе получения соевых белковых концентратов.

Ключевые слова: Trichoderma reesei, полигалактуроназа, эндоглюканаза, ксиланаза, некрахмальные полисахариды, ферментационная среда

DOI: 10.31857/S055510992101030X

В основе многих технологий в пищевой и кормовой промышленности лежит переработка растительного сырья с использованием ферментных препаратов (**ФП**) карбогидраз. Ферментативный гидролиз основных некрахмальных полисахаридов (**НКП**) растительных тканей – целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых веществ, позволяет повышать пищевую и кормовую ценность сырья, получать специализированные продукты с требуемыми характеристиками, улучшать параметры технологических процессов и качество готовой продукции [1, 2].

Штаммы мицелиальных грибов отличаются высокой продуктивностью и способностью синтезировать широкий спектр ферментов, что дает возможность рассматривать их как перспективные источники карбогидраз для создания комплексных препаратов сбалансированного состава, обеспечивающих эффективный гидролиз основных НКП различных видов растительного сырья [2, 3]. Наиболее известным промышленным продуцентом целлюлаз и гемицеллюлаз является гриб *Trichoderma reesei*, секретирующий более 15 различных карбогидраз. Основные компоненты ферментного комплекса штаммов *T. reesei* – целлобиогидролазы, эндоглюканазы (**ЭГ**), ксиланазы (**КС**), β-глюкозидазы. В меньшем количестве *T. reesei* синтезирует маннаназу, арабинофуранозидазу, ксилоглюканазу и некоторые другие ферменты, участвующие в гидролизе полимеров растительного сырья [4–6]. Известно, что некоторые штаммы *T. reesei* при культивировании в присутствии индукторов синтезируют в небольшом количестве внеклеточную полигалактуроназу (**ПГ**)

[7–10]. ПГ катализирует гидролиз α-1,4-гликозидных связей в полигалактуроновой кислоте и относится к ключевым ферментам при гидролизе пектиновых веществ [1, 11, 12].

В ходе ранее проведенных исследований нами был получен мутантный штамм *T. reesei* Co-44 с увеличенной продукцией КС и ЭГ – ключевых ферментов при гидролизе основных НКП зернового сырья в кормопроизводстве [13]. Кроме того, показано повышение уровня биосинтеза ряда сопутствующих ферментов, в том числе ПГ. На основании литературных данных, указывающих на высокое содержание пектиновых веществ в основных видах растительного сырья для пищевой и кормовой отрасли [1, 2, 14], сделано предположение, что увеличение продуктивности штамма *T. reesei* Co-44 по ПГ повысит эффективность получаемых на его основе ФП в различных технологических процессах.

Цель работы – получение комплексного ФП сбалансированного состава с увеличенной продукцией ПГ при высоком уровне синтеза ЭГ и КС на основе *T. reesei* Co-44.

МЕТОДИКА

Штамм микроорганизма. Объект исследования – штамм *T. reesei* Co-44 (ВКМ F-4789D), полученный с использованием гамма-мутагенеза из штамма *T. reesei* ВСМ 18.2/КК – промышленного продуцента целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов [13].

Подготовка посевного материала. Для получения посевного материала использовали модифицированную среду SM следующего состава (%): KH_2PO_4 – 0.2, глюкоза – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.4, пептон – 0.6, солодовое сусло – 2.0, агар-агар – 2.0. Штамм выращивали на агаризованной среде в течение 7 сут при 30°C и 7 сут при комнатной температуре на свету. Споровый посевной материал на агаризованной среде хранили при температуре 5°C не более 3 мес.

Глубинное культивирование в колбах. Продуцент выращивали на термостатируемых качалках (250 об./мин) при 30°C в течение 120 ч в колбах объемом 750 мл с 50 мл ферментационной среды следующего состава (%): лактоза – 2.0, аморфная целлюлоза – 1.0, солодовые ростки – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, KH_2PO_4 – 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.6, $CaCl_2$ – 0.06, водопроводная вода, pH среды 4.8–5.0. В опытные ферментационные среды вместо аморфной целлюлозы вносили различные индукторы биосинтеза карбогидраз. Среды засевали 2 мл суспензии спорового посевного материала с титром 10^6 спор/мл.

Биомассу гриба после выращивания отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин. Культуральную жидкость (**КЖ**) использовали для определения активности целевых ферментов.

Получение сухих ФП. Продуцент выращивали в качалочных колбах объемом 750 мл с 50 мл исходной ферментационной среды или среды с выбранным индуктором синтеза карбогидраз на термостатируемых качалках (250 об./мин) при 30°C в течение 96–120 ч. Биомассу выращенной глубинно культуры отделяли центрифугированием на ЦЛС-3 с ротором РУ 8-90 (фактор разделения 6000) в течение 20 мин. Сухой ФП получали осаждением супернатанта КЖ этиловым спиртом в соотношении 1:5 с последующим центрифугированием в течение 15 мин и высушиванием образовавшегося осадка при комнатной температуре.

Определение активности ПГ, КС и ЭГ. Активность определяли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (**ВС**) при гидролизе K-соли полигалактуроновой кислоты, ксилана из древесины березы и Na-карбоксиметилцеллюлозы (**КМЦ**) соответственно. ВС определяли по методу Шомоди–Нельсона. За 1 ед. активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль ВС эквивалентных 1 мкмолю глюкозы за 1 мин при 50°C, pH 5.0, и концентрации соответствующих субстратов в реакционной смеси 1% [15, 16]. Содержание растворимого белка определяли по методу Лоури.

Результаты получали не менее чем в трех повторностях.

Определение pH-оптимума. Оптимальный pH для действия КС, ЭГ и ПГ определяли при 30°C в диапазоне значений pH 3.0–9.0. Для получения растворов с заданным значением pH использовали 0.1 М универсальный буфер.

Определение температурного оптимума. Активности КС, ЭГ и ПГ определяли при pH 5.0 в диапазоне температур 30–80°C.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили при концентрации геля 12% в 25 мМ трис-глициновом буфере, pH 8.3, с ДДС-Na в концентрации 1 мг/мл в ячейке для электрофореза “Mini Protein Cell system” (“Bio-Rad”, США). Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим G-250 (“Amresco”, США). В качестве белков-маркеров молекулярной массы использовали: β-галактозидазу (116.0 кДа), бычий сывороточный альбумин (66.2 кДа), овальбумин (45.0 кДа), лактатдегидрогеназу (35.0 кДа), REase Bsp981 *E.coli* (25.0 кДа), β-лактоглобулин (18.4 кДа), лизоцим (14.4 кДа)

Масс-спектрометрический анализ. Анализ проводили в ЦКП “Промышленной биотехнологии”

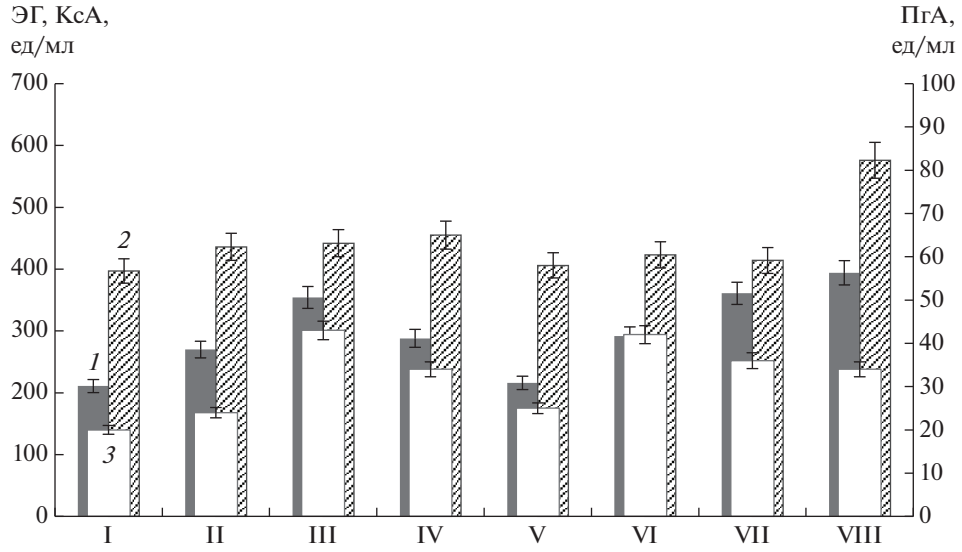

Рис. 1. Влияние различных добавок на синтез внеклеточных ЭГ (*1*), КС (*2*) и ПГ (*3*) штаммом *T. reesei* Co-44: I – аморфная целлюлоза (АЦ), контроль, II – яблочный пектин н/э (ЯП), III – пектиновые волокна (ПВ), IV – свекловичный жом (СЖ), V – соевая шелуха (СШ), VI – КНВС, VII – соевая мука (СМ), VIII – овсяная мука (ОМ).

ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН на масс-спектрометре "UltraflexXtreme" ("Bruker Daltonik GmbH", Германия). Исследуемый белок вырезали из полиакриламидного геля, обрабатывали трипсином, гидролизат анализировали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Обработку полученных данных проводили с использованием программы "Bruker Data Analysis" ("Brucker Corporation", США). Поиск исследуемого фермента по масс-спектрам базах данных белков NCBI и SWISS-PROTT осуществляли по программе "Peptide Mass Fingerprint" ("Matrix Science Inc.", США).

Гидролиз НКП. Для оценки эффективности гидролиза в качестве субстрата использовали тостированный соевый шрот, экструдированный с использованием двухшнекового экструдера ("Werner & Pfleiderer Continua 37", Германия) при температуре 120–130°C. В качестве коммерческих аналогов использовали ФП Целлолюкс F ("Сиббиофарм", Россия) и ФП Ладозим Респект Оптима ("Микробиопром", Россия). ФП дозировали по активности ЭГ из расчета 5 ед. на 1 г сырья. Гидролиз проводили в течение 5 ч при температуре 40°C при естественном pH водной суспензии экструдированного соевого шрота (**ЭСШ**) в диапазоне pH 6.0–6.2, при гидромодуле 1:6. Полученный гидролизат центрифугировали в течение 20 мин, осадок высушивали до постоянной влажности и определяли содержание сырого протеина по ГОСТ 13496.4-93. Контрольный вариант инкубировали в аналогичных условиях (5 ч, 40°C, 220 об./мин) без внесения ФП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор индуктора биосинтеза целевых карбогидраз *T. reesei*. Из данных литературы известно, что при культивировании на ферментационных средах, содержащих индукторы экспрессии генов КС и ЭГ (лактозу, целлюлозу), *T. reesei* синтезирует ПГ конститутивно, в минимальных количествах [7–10]. Внесение различных источников пектина существенно увеличивало продукцию ПГ [8]. На первом этапе исследований был модифицирован состав исходной ферментационной среды для индукции синтеза карбогидраз в сторону увеличения пектиназной активности. Для оценки влияния различных источников углерода на уровень биосинтеза ПГ, КС и ЭГ штаммом *T. reesei* Co-44 в исходную среду вместо 1%-ной аморфной целлюлозы в качестве индукторов биосинтеза карбогидраз вносили 1.0% яблочного пектина с низкой степенью этерификации, пектиновые волокна, свекловичный жом, соевую шелуху, концентрат низкомолекулярных веществ сои (**КНВС**), соевую и овсяную муку (рис. 1).

Наиболее сбалансированный состав карбогидраз (максимальная активность ПГ при высоком уровне ЭГ и КС) был получен при использовании пектиновых волокон в качестве индуктора. Активность ЭГ, КС и ПГ при этом составила 354 ± 17, 442 ± 21 и 43 ± 2 ед./мл соответственно. Почти такой же результат был получен при использовании соевой муки, активность тех же ферментов составила 361 ± 18, 414 ± 20 и 36 ± 2 ед./мл соответственно. Свекловичный жом обеспечивал высокий уровень активности КС – 455 ± 22 ед./мл, од-

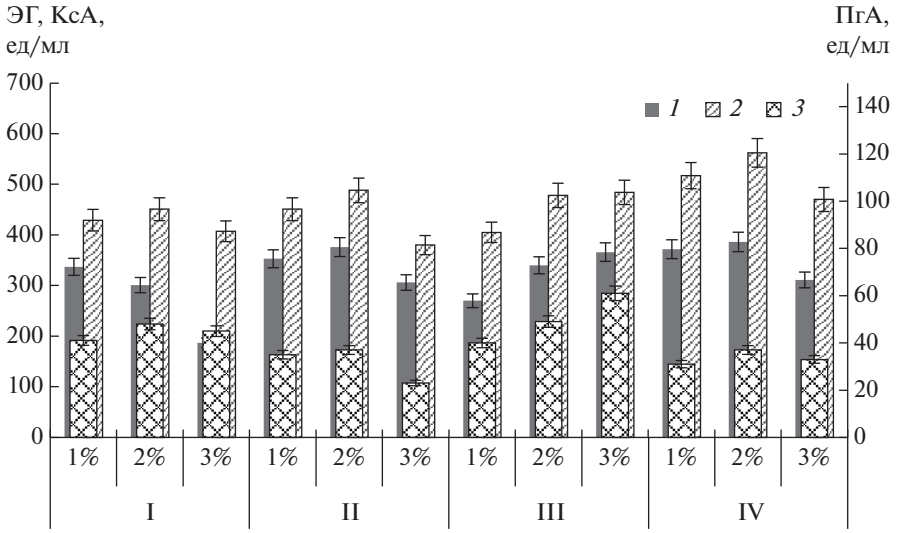

Рис. 2. Зависимость синтеза ЭГ (*1*), КС (*2*) и ПГ (*3*) штаммом *T. reesei* Co-44 от концентрации индукторов: I – ПВ, II – СМ, III – КНВС, IV – ОМ.

нако активность ЭГ и ПГ была ниже, чем в варианте с пектиновыми волокнами – 288 ± 15 и 34 ± 2 ед./мл соответственно. Использование овсяной муки позволяло получить высокий уровень активности ЭГ – 394 ± 19 ед./мл, повышенную активность КС – 576 ± 29 ед./мл, при несколько пониженной активности ПГ – 34 ± 2 ед./мл. Положительный эффект соевой муки и КНВС на синтез целевых ферментов штаммом *T. reesei* Co-44 согласуется с литературными данными об индуцирующем действии компонентов сои на биосинтез карбогидраз *T. reesei* [17, 18]. Внесение в ферментационную среду КНВС – побочного продукта получения соевых белковых концентратов, содержащего низкомолекулярные углеводы, растворимые азотсодержащие вещества и ростовые факторы сои (витамины, нуклеиновые кислоты и др.) [19], позволило получить высокое значение активности ПГ – 42 ± 2 ед./мл при среднем уровне активности ЭГ и КС – 292 ± 15 и 423 ± 24 ед./мл соответственно.

Далее штамм *T. reesei* Co-44 культивировали с добавлением компонентов, обеспечивших индукцию целевых ферментов: пектиновые волокна, КНВС, соевая и овсяная мука, в концентрации от 1 до 3% (рис. 2).

Из полученных результатов (рис. 2) следует, что 2% пектиновых волокон обеспечивало повышение активности ПГ до 48 ± 2 ед./мл, добавление к среде 3% КНВС – до 61 ± 3 ед./мл. Низкомолекулярные олигосахариды, входящие в состав соевой и овсяной муки, преимущественно индуцировали биосинтез ксиланазы и эндоглюканазы. При увеличении концентрации пектиновых волокон, соевой и овсяной муки до 3% наблюдалось повышение вязкости ферментационных сред, что, по-видимому, приводило к ухудшению массообмена в среде при культивировании в колбах и снижению синтеза карбогидраз штаммом-продуцентом. При этом КНВС в концентрации 3% в меньшей степени влиял на вязкость среды и позволял получить наиболее сбалансированный комплекс ферментов: активность ЭГ, КС и ПГ составила 366 ± 18, 484 ± 23 и 61 ± 3 ед./мл соответственно.

Результаты серии последующих экспериментов с увеличением концентрации КНВС от 3 до 9% (рис. 3) позволяют окончательно показать перспективность использования этого компонента в ферментационной среде для увеличения био-

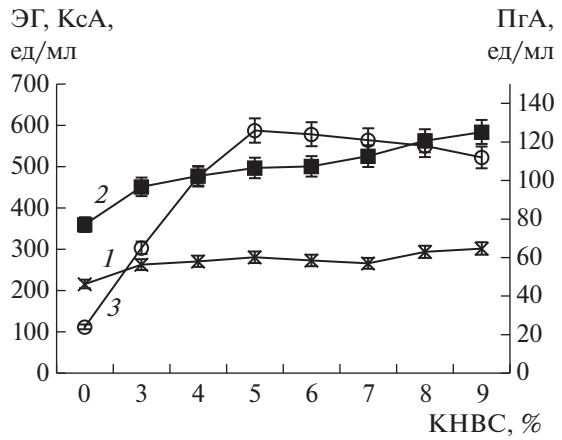

Рис. 3. Зависимость активности ЭГ (*1*), КС (*2*) и ПГ (*3*) от концентрации в ферментационной среде КНВС при культивировании *T. reesei* Co-44.

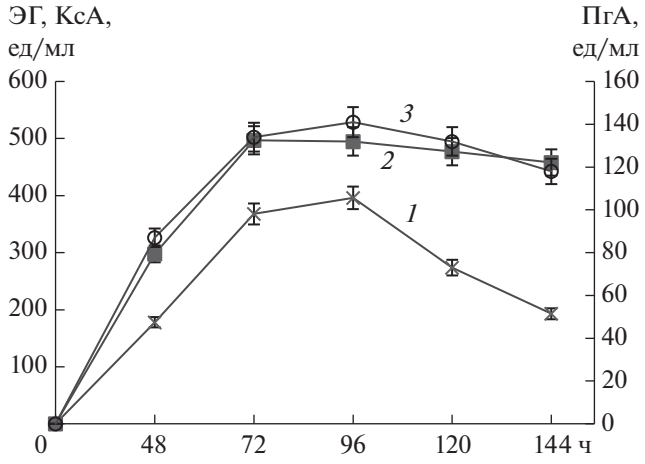

Рис. 4. Динамика накопления ЭГ (*1*), КС (*2*) и ПГ (*3*) при культивировании *T. reesei* Co-44 на среде с 5% КНВС.

синтеза комплекса карбогидраз штаммом *T. reesei* Co-44. При увеличении концентрации КНВС до 5% наблюдалось существенное повышение активности ПГ – практически в 6 раз по сравнению с контролем, без КНВС. Дальнейшее увеличение концентрации КНВС до 9% приводило к небольшому снижению активности ПГ. Активности КС и ЭГ возрастали более умеренно при повышении содержания в среде КНВС до 5% – на 38 и 30% соответственно по сравнению с контролем без КНВС. При дальнейшем повышении концентрации КНВС от 5 до 9% продуктивность штамма по биосинтезу КС увеличивалась на 17.5%, а ЭГ – на 7.5% по сравнению с вариантом с 5% КНВС.

Оптимальное соотношение активностей целевых ферментов для получения ФП сбалансированного состава было достигнуто при культивировании *T. reesei* Co-44 на среде с 5% КНВС: активность ПГ составила 126 ± 7 ед./мл, ЭГ – 281 ± 14 ед./мл, КС – 497 ± 26 ед./мл (рис. 3).

Таким образом, оптимизация состава ферментационной среды позволила увеличить продукцию ПГ мутантным штаммом более чем в 5 раз при сохранении высокого уровня биосинтеза и сбалансированном соотношении ЭГ и КС.

На среде с 5% КНВС была изучена динамика биосинтеза целевых карбогидраз штаммом *T. reesei* Co-44 (рис. 4). Установлено, что максимальное накопление ЭГ и ПГ наблюдалось на 96 ч роста, КС – на 72 ч. После 96 ч культивирования резко снижалась продукция ЭГ: на 120 ч роста на 30%, на 144 ч – более чем на 50%. Снижение активности ПГ и КС к 144 ч было менее существенно – 16.3 и 7.5% соответственно.

Таким образом, выбор добавок, содержащих индукторы биосинтеза карбогидраз, и времени культивирования мутантного штамма *T. reesei* Co-44 позволил получить в КЖ сбалансированный комплекс карбогидраз эндодеполимеразного действия с увеличенным содержанием необходимых компонентов: активность ПГ после 96 ч культивирования на среде с 5% КНВС составила 141 ± 6 ед./мл, КС и ЭГ – 495 ± 26 и 396 ± 21 ед./мл соответственно.

Свойства ФП, полученного на основе штамма *T. reesei* Co-44 при культивировании в оптимизированных условиях. Сухой ФП сбалансированного состава (далее Ксилоризин К4) был получен, как описано в разделе “Методика”, осаждением этиловым спиртом из КЖ, полученной в результате выращивания мутантного штамма *T. reesei* Co-44 в качалочных колбах в течение 96 ч на среде с 5% КНВС. В качестве контроля аналогичным способом был получен сухой ФП1 из КЖ, полученной при культивировании *T. reesei* Co-44 на исходной среде в течение 120 ч. В полученных ФП были определены активности целевых карбогидраз, а также содержание белка.

Как показали результаты табл. 1 активность ПГ в препарате Ксилоризин К4 была увеличена в 7.8 раз по сравнению с контрольным ФП, полученным на исходной среде, ЭГ – почти в 2 раза; активность КС была увеличена незначительно.

Известно, что в растительном сырье пектин часто может быть одним из основных компонентов клеточной стенки, связанным с волокнами целлюлозы и гемицеллюлозы [2, 20], поэтому для эффек-

Таблица 1. Содержание белка и активность полигалактуроназы, ксиланазы и эндоглюканазы в ФП на основе штамма *T. reesei* Co-44

ФП	Содержание белка, мг/г	Активность карбогидраз, ед./г		
		ПГ	КС	ЭГ
ФП1, контроль (120 ч на исходной среде)	323 ± 15	360 ± 19	11500 ± 590	6900 ± 350
Ксилоризин К4 (96 ч на среде с 5% КНВС)	376 ± 18	2800 ± 125	12250 ± 620	13580 ± 670

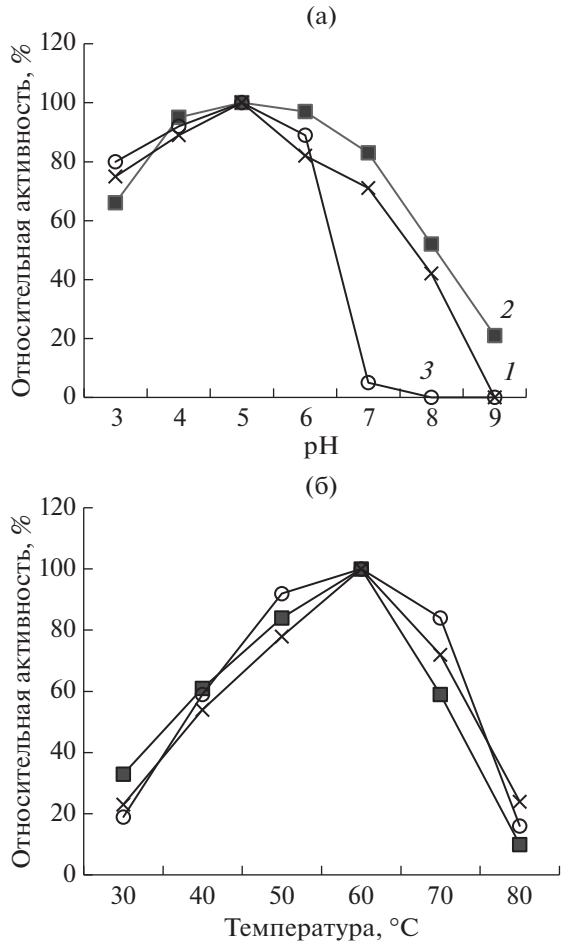

Рис. 5. Зависимость активности ЭГ (*1*), КС (*2*) и ПГ (*3*) в ФП Ксилоризин К4 от pH (а) и температуры (б).

тивного гидролиза требуется высокая активность всех ключевых карбогидраз: эндоглюканазы, ксиланазы, пектиназы. ФП Ксилоризин К4, полученный в оптимизированных условиях, в значительной степени соответствовал такому требованию.

Изучение влияния pH и температуры на активность ФП, позволило найти оптимальные условия для его практического применения. Карбогидразы ФП Ксилоризин К4 проявляли высокую активность в пределах pH от 3 до 6 и температуры от 40 до 70°C (рис. 5), что позволило проводить обработку растительного сырья без предварительной коррекции pH реакционной смеси при температурах от 40 до 60°C, принятых в большинстве технологических процессов в пищевой и кормовой промышленности [1, 2].

Для определения состава ФП Ксилоризин К4 был проведен электрофорез в присутствии ДДС-Na (рис. 6а), при этом была обнаружена полоса с молекулярной массой ~40–41 кДа, которая предположительно соответствовала ПГ *T. reesei*. В контрольном ФП1, полученном при культивировании *T. reesei* Co-44 на исходной среде с 1% аморфной целлюлозы, эта полоса практически не видна. Результаты масс-спектрометрического анализа трипсиновых гидролизатов этой полосы подтвердили соответствие белка эндо-полигалактуроназе (GH28) *T. reesei* (рис. 6б).

Исследование эффективности использования ФП Ксилоризин К4 для получения белковых концентратов из соевого шрота. В связи с дефицитом животного белка, в качестве белковых пищевых и кормовых

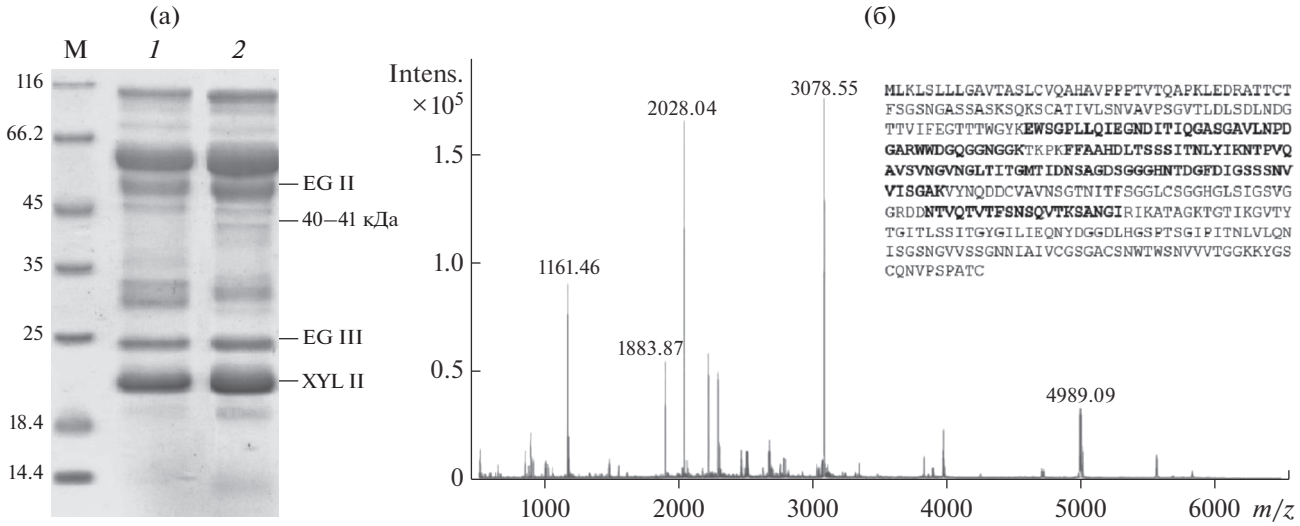

Рис. 6. Электрофореграмма ФП, полученных из КЖ *T. reesei* Co-44 при культивировании в колбах на исходной ферментационной среде в течение 120 ч (ФП1, дорожка *1*) и на среде с 5% КНВС в течение 96 ч (Ксилоризин К4, дорожка *2*): а – MALDI-TOF-масс-спектр трипсинового гидролизата белковой полосы, соответствующей ЭГ *T.reesei*. Полужирным шрифтом выделены пептиды, совпадающие с аминокислотной последовательностью ЭГ GH28 *T.reesei* QM6a (б). M – белки-маркеры молекулярной массы.

Таблица 2. Активность полигалактуроназы, ксиланазы и эндоглюканазы в ФП, использованных для обработки экструдированного соевого шрота

ФП	Активность карбогидраз, ед/г		
	ПГ	КС	ЭГ
Ксилоризин К4	2800 ± 125	12250 ± 620	13580 ± 670
Целлолюкс F	–	1440 ± 75	3500 ± 180
Ладозим Респект Оптима	340 ± 18	240 ± 15	350 ± 20

добавок широко используют продукты на основе сои и соевого шрота. Одним из способов повышения содержания белка в соевых продуктах является обработка экструдированных шротов ферментами, способными переводить основные НКП сои в растворимое состояние, с последующим “вымыванием” водорастворимых продуктов гидролиза. Такая технология наиболее актуальна при производстве кормов для аквакультуры, где частичное устранение углеводных компонентов позволяет получать концентраты с высоким содержанием сырого протеина. Соевые белковые продукты способны полноценно заменить в рационах плотоядных рыб наиболее дорогой и труднодоступный компонент – рыбную муку, содержание которой в кормах стараются снизить за счет использования альтернативных источников белка [21, 22].

Соя характеризуется высоким содержанием пектиновых веществ, и для ее ферментативной обработки целесообразно использовать ФП, обладающие помимо активности КС и ЭГ активностью ПГ [23]. Большинство ФП карбогидраз кормового назначения, полученных на основе одного штамма-продуцента, в качестве основных компонентов содержат целлюлазы и/или гемицеллюлазы. Препараты, обладающие дополнительно пектиназной активностью, как правило, получают смешиванием ферментов, произведенных несколькими продуцентами, что существенно повышает себестоимость конечного продукта [2].

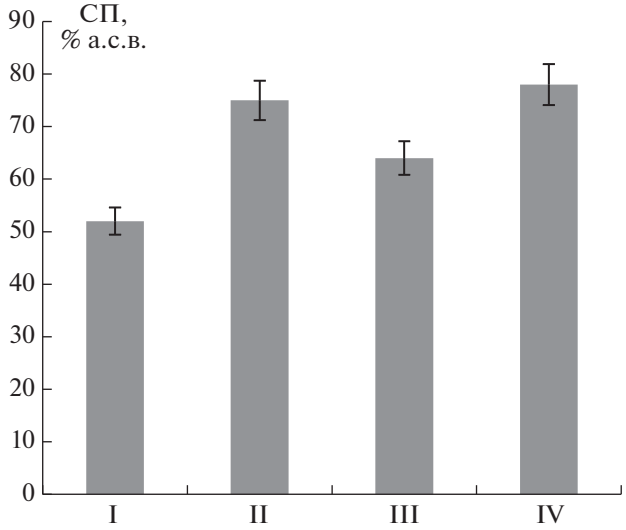

Рис. 7. Содержание сырого протеина (СП) в соевых продуктах после обработки экструдированного соевого шрота ферментными препаратами карбогидраз: I – без ФП (контроль), II – Ксилоризин К4, III – Целлолюкс F, IV – Ладозим Респект Оптима.

Эффективность использования Ксилоризина К4 при получении соевых белковых концентратов определяли в сравнении с коммерческими препаратами: Целлолюксом F (“Сиббиофарм”, Россия) с высокой активностью ЭГ и КС и Ладозимом Респект Оптима (“Микробиопром”, Россия), состоящим из смеси препаратов со сбалансированным содержанием ЭГ, ПГ и КС (табл. 2). ФП дозировали, уравнивая по активности эндоглюканазы. Соевый шрот предварительно экструдировали, чтобы перевести белок сои в нерастворимое денатурированное состояние с целью снижения его потерь при последующем смешивании с водой.

Критерием эффективности действия исследуемых препаратов было содержание сырого протеина в полученных белковых соевых концентратах.

В результате обработки экструдированного соевого шрота Ксилоризином К4 содержание сырого протеина в белковом продукте увеличилось на 44% по сравнению с вариантом без применения ФП и на 17% по сравнению с обработкой Целлолюксом F, не содержащим пектиназ (рис. 7). Эффективность применения ФП на основе нового мутантного штамма была сопоставима с эффективностью препарата Ладозим Респект Оптима, полученного с использованием двух продуцентов и имеющего полный комплекс карбогидраз, необходимый для гидролиза основных НКП сои. Учитывая влияние содержания сырого протеина на стоимость кормовых продуктов, можно сделать вывод о перспективности применения Кси-

лоризина К4 для обработки экструдированного соевого шрота в процессе получения кормовых добавок с повышенным содержанием белка за счет разрушения и устранения антипитательных НКП. Применение комплексного ФП Ксилоризин К4 позволит ввести в кормовые рационы альтернативные источники белка и снизить себестоимость конечной продукции.

Следует отметить, что в настоящее время все представленные на рынке кормовые ФП, эффективно гидролизующие НКП растительного сырья, являются смесями, полученными на основе препаратов нескольких продуцентов. Кроме того, учитывая резкое подорожание импортных ФП, применение отечественного комплексного препарата с уникальными свойствами – полным набором карбогидраз для обработки сырья с высоким содержанием целлюлозы, гемицеллюлоз и пектиновых веществ, существенно увеличит экономическую эффективность производства кормов на основе растительного сырья.

Таким образом, в результате проведенной работы синтез полигалактуроназы штаммом *T. reesei Co*-44 был увеличен более чем в 8 раз при высоком уровне активности КС и ЭГ, что позволило получить комплексный ФП сбалансированного состава, высокоэффективный при обработке экструдированного соевого шрота в процессе промышленного получения белковых кормовых добавок.

При проведении работы было использовано оборудование ЦКП “Промышленной биотехнологии” ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2021 гг. (тема № 0529-2019-0066).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Михайлова Р.В.* Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. Минск: Белорусская наука, 2007. 407 с.
2. *Bedford M.R., Partridge G.G.* Enzymes in Farm Animal Nutrition. Wallingford, Oxforshire, UK: Cambridge, MA: CAB International, 2010. 319 p.
3. *Sajith S., Priji P., Sreedevi S., Benjamin S.* // J. Nutr. Food Sci. 2016. V. 6. P. 461. https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461
4. *Herpoël-Gimbert I., Margeot A., Dolla A., Jan G., Mollé D., Lignon S., Mathis H., Sigoillot J.-C., Monot F., Asther M.* // Biotechnol. Biofuels. 2008. V. 1. P. 18 https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-1
5. *Druzhinina I.S., Kubicek C.P.* // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. № 6. P. 1485–1499. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12726
6. *Payne C.M., Knott B.C., Mayes H.B., Hansson H., Himmel M.E., Sandgren M., Ståhlberg J., Beckham G.T.* // Chem Rev. 2015. V. 115. № 3. P. 1308–448. https://doi.org/10.1021/cr500351c
7. *Markovič O., Slezárik A., Labudová I.* // FEMS Microbiol. Letters. 1985. V. 27. № 3. P. 267–271. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00680.x
8. *Olsson L., Christensen T.M.I.E., Hansen K.P., Palmqvist E.A.* // Enzyme Microbial Technol. 2003. V. 33. № 5. P. 612–619. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00181-9
9. *Mohamed S.A., Christensen T.M.I.E., Mikkelsen J.D.* // Carbohyd. Res. 2003. V. 338. № 6. P. 515–524.
10. *Saloheimo M., Pakula T.* // Microbiology. 2012. V. 158. № 1. 46–57. https://doi.org/10.1099/mic.0.053132-0
11. *Pedrolli D.B., Monteiro A.P., Gomes E.L., Carmona E.C.* // The Open Biotechnol. J. 2009. V. 3. P. 9–18. https://doi.org/10.2174/1874070700903010009
12. *Tapre A., Jain R.K.* // International Food Research Journal. 2014. V. 21. № 2. P. 447–453.
13. *Kostyleva E.V., Tsurikova N.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Veselkina T.N., Lobanov N.S., Shashkov I.A., Sinitsyn A.P.* // Microbiology. 2018. V. 87. P. 652–661. https://doi.org/10.1134/S0026261718050120
14. *Vanitha T., Khan M.* Role of Pectin in Food Processing and Food Packaging. In: Pectins – Extraction, Purification, Characterization and Applications. 2019. https://doi.org/10.5772/intechopen.83677
15. *Collmer A., Reid J., Mount M.* // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 329–335.
16. *Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А.* Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: МГУ, 1995. 144 с.
17. *Hao X.-C., Yu X.-B., Yan Zh.-L.* // Food Technol. Biotechnol. 2006. V. 44. № 1. P. 89–94.
18. *Saravanan P., Muthuvelayudham R., Viruthagiri T.* // Enzyme Research. 2012. V. 2012. P. 7. https://doi.org/10.1155/2012/157643
19. *Хабибулина Н.В., Бикбов Т.М., Пономарев В.В.* // Проектная культура и качество жизни. 2015. № 1. С. 473–491.
20. *Sundarraj A.A., Ranganathan T.V.* // International J. Applied Environmental Sciences. 2017. V. 12. № 10. P. 1777–1801.
21. *Barnes M., Brown M., Rosentrater K., Sewell J.* // Open J. Animal Sciences. 2012. V. 2. № 4. P. 234–243. https://doi.org/10.4236/ojas.2012.24033
22. *Delgado E., Reyes-Jaquez D.* // Extrusion of Metals, Polymers and Food Products. 2017. https://doi.org/10.5772/65577
23. *Karr-Lilienthal L.K., Kadzere C.T., Grieshop C.M., Fahey G.C.* // Livestock Production Science. V. 97. № 1. 2005. P. 1–12.

Obtaining of the Complex Enzyme Preparation with Enhanced Pectinase Activity Using a New Mutant Strain *T. reesei* Co-44

E. V. Kostyleva[a, *], A. S. Sereda[a], I. A. Velikoretskaya[a], A. M. Aisina[a], N. V. Tsurikova[a], E. A. Rubtsova[b], A. D. Satrutdinov[b], and A. P. Sinitsyn[b, c]

[a] *All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of FRC of food, biotechnology, and food safety, Moscow, 111033 Russia*

[b] *Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

[c] *Chemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: ekostyleva@list.ru*

In order to obtain a complex enzyme preparation providing efficient hydrolysis of the main plant non-starch polysaccharides — cellulose, xylans, and pectin, studies were conducted to optimize a fermentation medium composition for submerged cultivation of a new mutant strain *T. reesei* Co-44 – a highly active producer of endo-carbohydrases. A concentrate of soy low molecular components was chosen as the inducer of the key carbohydrases biosynthesis by the strain. The concentrate provided the maximum increase in polygalacturonase activity – more than 8 times, and an increased level of endoglucanase and xylanase biosynthesis. After cultivation of *T. reesei* Co-44 under optimized conditions, a complex enzyme preparation Xylorizin K4 was obtained, its physicochemical properties were studied. Using electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, the presence of endopolygalacturonase (GH28) *T.reesei* in Xylorizin K4 was confirmed. The studies have shown the potential of Xylorizin K4 application in production of soy protein concentrates to eliminate the main soybean non-starch polysaccharides.

Key words: Trichoderma reesei, polygalacturonase, endoglucanase, xylanase, non-starch polysaccharides, fermentation medium

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 77–86

УДК 579.222

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕВАНА *Azotobacter vinelandii* В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТА БИОСОРБЕНТОВ СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И РАДИОНУКЛИДОВ

© 2021 г. В. В. Шутова[1, *], В. В. Ревин[1], Е. А. Калинкина[1], А. В. Сафонов[2], А. Г. Савченко[4], Г. В. Максимов[3, 4]

[1]*Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск, 430005 Россия*

[2]*Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119991 Россия*

[3]*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 119892 Россия*

[4]*Национальный исследовательский технологический университет "МИСиС", Москва, 119049 Россия*

**e-mail: vshutova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 30.03.2020 г.
После доработки 31.08.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Показано, что культивирование *Azotobacter vinelandii* Д-08 на средах с мелассой и бардой увеличивало активность левансахаразы и биосинтез левана. Максимальная удельная активность левансахаразы также была получена на среде с мелассой, что коррелировало с максимальным синтезом полисахарида. Бактерии синтезировали в такой среде дополнительную фракцию высокомолекулярного левана (более 1000 кДа) с измененной молекулярной структурой (снижение вклада колебаний двойных связей и меньшей гидратированностью молекулы), что сопровождалось увеличением связывания молекулой Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe из среды культивирования. Криогели на основе поливинилового спирта и левана были способны эффективно сорбировать ионы меди (максимально за 1 ч), цинка (за 24 ч) и кадмия (за 10 мин), а также радиоактивные плутоний (максимально за 4 ч) и уран (максимально за 168 ч), что свидетельствует о возможности их использования в качестве сорбентов при очистке стоков различных предприятий от тяжелых металлов и радионуклидов.

Ключевые слова: леван, *Azotobacter vinelandii* Д-08, адсорбция, ионы меди, ионы кобальта, радионуклиды

DOI: 10.31857/S0555109921010347

В настоящее время актуальной задачей биотехнологии является разработка новых технологий очистки сточных вод, содержащих высокотоксичные соединения тяжелых металлов и радионуклиды [1, 2]. В основе ряда технологий важное место занимают сорбционные методы, обеспечивающие максимальное извлечение соединений тяжелых металлов и радионуклидов, а в качестве сорбентов – биоматериалы с высокой эффективностью сорбции и механической прочностью [3, 4]. Для решения проблемы очистки стоков предприятий с многокомпонентными отходами, содержащими тяжелые металлы и радионуклиды (атомные станции и предприятия по добыче и обогащению урановой руды), предлагается использовать микробные экзополисахариды. Очевидно, что биоматериал, используемый для сорбции ионов тяжелых металлов и радионуклидов, должен обладать не только хелатирующими свойствами, но и стабильной гидрофильной трехмерной структурой, обеспечивающей возможность фильтрации воды в течение длительного периода времени. Существенным моментом при создании новых технологий очистки сточных вод может быть использование полисахаридов с подходящей молекулярной структурой [5], затраты на получение которых при культивировании бактерий на средах с вторичными продуктами пищевых производств могут быть минимальными.

Такому критерию могут соответствовать биоматериалы на основе полисахаридов, а также композитные гидрогели [6–8]. Технология производства данных биосорбентов (гидрогель) включает формирование комплекса биополимеров (хитозана, альгината, крахмала и др.) с синтетическими полимерами – полиакриламидом [9], поливиниловым спиртом [10, 11], поливинипирролидоном [12]. Например, гидрогели на основе хитозана

обладают высокой сорбционной способностью для свинца [13] и меди [14], а гидрогель, состоящий из хитозана, желатина и полиакриламида (матрица) – высокой прочностью и сорбционной емкостью для меди и свинца [15].

Таким образом, удаление ионов тяжелых металлов из сточных вод возможно с помощью разработки адсорбента, в состав которого входит полисахарид (например альгинат или леван). Для получения такого сорбента может использоваться полисахарид *Azotobacter vinelandii* – грамотрицательной почвенной бактерии семейства *Pseudomonadaceae* [16, 17]. Известно, что внеклеточное накопление самого значимого полисахарида бактерии (альгината) выполняет барьерную функцию для проникновения к бактерии кислорода или тяжелых металлов, что особенно важно при разработке биосорбентов [16]. Другим полисахаридом бактерии, который может быть использован для создания биоадсорбента, является леван [17, 18]. Леван представляет собой разветвленный гомополисахарид, полифруктан из остатков D-фруктофуранозы с высокой молекулярной массой (10^3–10^8 Да) [20, 21]. Молекула левана состоит из остатков фруктофуранозы, соединенных β-(2, 6)-связями в цепях и α-(2, 1)-связями в местах ветвления, и имеет D-глюкозильный остаток на конце. При культивировании бактерий на средах с сахарозой синтезируется также внеклеточная левансахараза, расщепляющая сахарозу на глюкозу и фруктозу, при этом фруктоза используется для биосинтеза полисахарида, а глюкоза – в метаболизме бактерии [22].

Для бактериального синтеза полисахаридов важен состав культуральной среды (углерод, азот, микро- и макроэлементы и т.д.) [23]. Для повышения рентабельности производства биоадсорбентов были предложены субстраты – вторичные продукты пищевой промышленности, меласса (вторичный продукт сахарного производства), послеспиртовая зерновая барда (вторичный продукт производства спирта). Известно, что меласса содержит (%): сухие вещества – 82, сахароза – 48.4, не сахара – 33.6, а барда – 33–45% сухих веществ затора [24, 25].

Цель работы – исследование свойств левана, получаемого при культивировании *A. vinelandii* Д-08 на средах с мелассой и бардой, для его использования в качестве компонента гидрогеля, способного к сорбции высокотоксичных соединений тяжелых металлов и радионуклидов.

МЕТОДИКА

Объект исследования, условия культивирования. Объектом исследования служили бактерии *Azotobacter vinelandii (Lipman)* Д-08, депонированные в ВКПМ как *Azotobacter chroococcum* B-5787. Для поддержания культуры *A. vinelandii* использовали агаризованную среду (г/л): KH_2PO_4 – 0.2; K_2HPO_4 – 0.8; $MgSO_4$ – 0.2; $CaSO_4$ – 0.1; $FeCI_3$ – следы; Na_2MoO_4 – следы; дрожжевой экстракт – 0.5; сахароза – 20.0; агар-агар – 15–20, pH 7.0–7.2. Бактерии выращивали при 28°C в течение 72 ч. Для выращивания инокулята бактерий *A. vinelandii* использовали жидкую питательную среду аналогичного состава. С поверхности агаризованной среды клетки смывали 10 мл питательной среды и засевали колбы на 250 мл со 100 мл среды с сахарозой. Инокулят выращивали в шейкерах Environmental shaker – Inkubator ES – 20/60 (Латвия) при 28°C и 250 об./мин 24 ч.

Для приготовления питательных сред использовали свеклосахарную мелассу с 48% сахарозы (Ромодановский сахарный завод, Россия). Для культивирования *A. vinelandii* с мелассой использовали контрольную среду с 4% сахарозы и среды с 5% мелассы (по сахарозе), в которые добавляли барду в количестве 2–15%. Бактерии выращивали при тех же условиях, что и инокулят при pH 7.0–7.2.

После окончания выращивания клетки осаждали центрифугированием при 8000 g 30 мин, количество биомассы определяли взвешиванием после высушивания образца при 100°C.

Получение криогеля. Для получения криогеля 1 г сухого полисахарида и 4 г поливинилового спирта (**ПВС**) растворяли в 50 мл воды, выдерживали при –20°C 12 ч, оттаивали, выдерживая при 8°C. Для получения однородных гранул криогель измельчали методом экструзии через отверстия определенного диаметра (d = 2 мм). В качестве контроля использовали криогель, полученный без добавления левана [26].

Активность левансахаразы. Активность левансахаразы регистрировали по накоплению глюкозы, которую определяли с помощью глюкозооксидазно-пероксидазного метода. Реакционная смесь включала: 3 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 6.5) с сахарозой (100 г/л) и 1 мМ $CaCl_2$. К смеси добавляли 0.5 мл супернатанта и инкубировали при 30°C в течение 7 мин. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль глюкозы в минуту [27]. Белок определяли методом Бредфорда.

Определение содержания левана. Осаждение полисахарида проводили из супернатанта культуральной жидкости (**КЖ**) 96%-ным этанолом (в соотношении 1 : 2) и высушивали при 102 ± 1.5°C. Содержание полисахарида определяли весовым методом по разнице между весом осадков, обра-

зовавшихся при добавлении этанола к культуральной жидкости и к среде после стерилизации.

Жидкостная хроматография полисахаридов. Разделение водорастворимых соединений из КЖ (20 мкл) проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 A Prominence (Япония) с колонкой Ultrahydrogel 6 × 40 mm Guard Column WATO11565 (Япония). В качестве подвижной фазы использовали деионизированую воду, скорость подачи растворителей не превышала 0.4 мл/мин при 25°C, длина волны оптического детектора – 190 нм. В качестве стандартов использовали декстран с молекулярной массой 12, 25, 80 и 670 кДа.

Инфракрасная спектроскопия. ИК-спектры образцов регистрировали с помощью ИК-Фурье-спектрометра IRPrestige-21 (“Shimadzu”, Япония) в диапазоне от 4000 до 400 см$^{-1}$. Сухой полисахарид измельчали вместе с KBr (~1 мг вещества + 250–300 мг KBr) и с помощью пресс-формы, получали таблетку для регистрации ИК-спектров.

Рентгенофлуоресцентный анализ (РФА). РФА полисахарида проводили для контроля элементного состава образца с помощью анализатора SciAps X_XRF (РФА) SciAps (США), оснащенного рентгеновской трубкой (напряжение 40 или 50 кэВ, ток до 200 мкА, Rh или Au-анод) и высокоскоростным кремниевым дрейфовым детектором площадью 20 мм^{2}SDD, с разрешением 135 эВ на 5.95 Мп K-альфа линии, 250 тыс. импульсов в с. В основе принципа действия анализатора лежит метод энергетической дисперсии, который заключается в анализе смешанных спектров, полученных после возбуждения характеристического рентгеновского излучения, что позволяет оценить вклад (масса, %) различных элементов. Метод позволяет контролировать содержание анализируемых элементов: 100% ~ 0.001%, с относительной погрешностью 0.5–20% (от веса) и стабильностью ≤0.3%, время анализа 1 мин. Высушенные образцы полисахарида фиксировали в ячейке прибора в специальной подложке и проводили анализ.

Содержание ионов меди и кобальта. Содержание ионов определяли с помощью метода спектрофотометрического анализа в водном растворе [28], используя цветную реакцию с 4-(2-пиридилазо)резорцином (**ПАР**) при длине волны 530 нм. Адсорбент и раствор соли металла (1 : 20) инкубировали в течение: 5, 10, 30 мин, 1, 2, 3 ч, 1 и 4 сут, затем удаляли адсорбент и к раствору соли металла (0.375 мл для соли кобальта, 0.875 мл для соли меди) добавляли 2 мл ПАР, доводя объем до 20 мл водой. Оптическую плотность растворов регистрировали в 1 см кювете относительно воды.

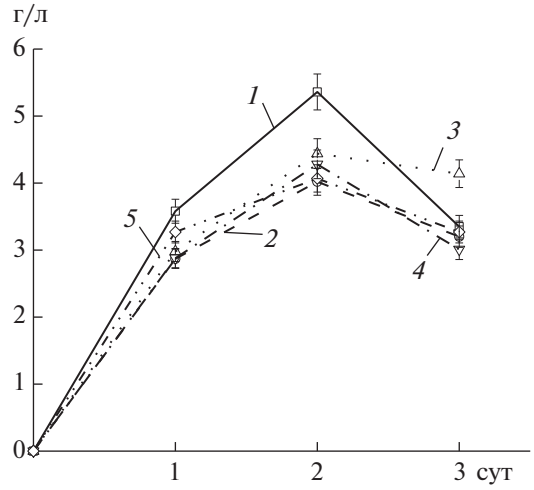

Рис. 1. Динамика роста *A. vinelandii* на средах с мелассой и различным содержанием барды: *1* – среда с мелассой; *2* – добавление барды, 2%; *3* – добавление барды, 5%; *4* – добавление барды, 10%; *5* – добавление барды, 15%.

Сорбцию радиоактивных образцов на адсорбенте. Сорбцию на сорбенте оценивали с помощью радионуклидов ^{233}U, ^{239}Pu. Эксперименты проводили при соотношении сорбент : раствор 1 : 50. Перед экспериментом в раствор вносили индикаторные количества - радионуклиды (моль/л): ^{233}U – 4.5 × 10^{-10}, ^{239}Pu – 8.7 × 10^{-8}, чтобы исходная концентрация активного нуклида в растворе составляла до 200 Бк/мл.

Радиоактивность. Радиоактивность регистрировали методом жидкостно-сцинтилляционного счета с помощью низкофонового альфа-бета-спектрометра Tri-Carb 3180TR/SL (“Perkin Elmer”, США) с использованием сцинтиллятора Perkin Elmer OptiphaseHisafe3 (соотношение сцинтиллятор : аликвота – 10 : 1). Степень сорбции (S, %) рассчитывали как долю радионуклида, перешедшего из воды на/в сорбент по формуле: $S = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%$, где C_0 и C – соответственно начальная и конечная концентрация радионуклида в растворе, Бк/мл.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excell 2015.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали условия синтеза и молекулярные характеристики левана, выделяемого при культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой и бардой. Установлено, что среда культивирования (**СК**) с добавлением 5% мелассы (по

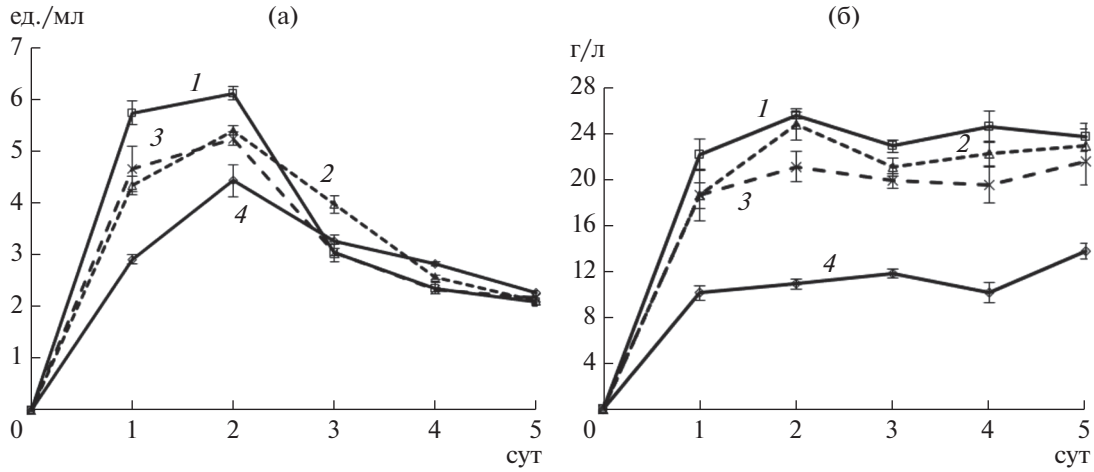

Рис. 2. Изменение активности левансахаразы (а, ед. /мл) и накопления левана (б, г /л) при культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой и бардой. *1* – среда с мелассой; *2* – добавление барды 5%; *3* – добавление барды 10%; *4* – среда с сахарозой.

сахарозе) и среды с 5% мелассы и добавлением 2–15% барды (комплексная среда) обеспечивали оптимальные условия для эффективного синтеза левансахаразы и левана.

Содержание биомассы при культивировании в присутствии мелассы достигало максимума на 2 сут, добавление барды к среде не оказывало существенного влияния на рост биомассы и только на 3 сут превышало контроль в СК с 5% барды (рис. 1). Максимальное содержание внеклеточного белка в КЖ было выявлено на 4 сут роста в среде с 10% барды (0.197 мг/мл).

При культивировании *A. vinelandii* левансахаразная активность была максимальной на 2 сут: на среде с мелассой (6.12 ед./мл) и на той же среде с добавлением барды 5 и 10% – 5.4 и 5.25 ед./мл соответственно. Максимальная активность левансахаразы соответствовала и максимальному выходу левана (рис. 2а). Для биотехнологического производства важно контролировать изменение удельной активности левансахаразы, поскольку оно может отражать также и содержание левана в КЖ (табл. 1). Максимальное количество полисахарида накапливалось в 1 сут, максимальная удельная активность левансахаразы зафиксирована на среде с мелассой, что коррелирует с максимальным выходом экзополисахарида (**ЭПС**).

При культивировании бактерий на среде с мелассой уже на 1 сут содержание левана составляло 22.2 г/л, на вторые сутки достигло максимума 25.6 г/л (рис. 2б), добавление в СК барды (комплексная среда) не способствовало увеличению синтеза левана: на 2 сут выход составил 24.8 г/л при добавлении 5% барды и при 10% барды – 21.1 г/л.

Для понимания механизма сорбции катионов леваном был исследован состав и структура полисахарида. Известно, что молекулярная масса левана зависит от штамма бактерии и может меняться от 5 до 3500 кДа [27]. Молекулярную массу синтезированных полисахаридов исследовали методом ВЭЖХ. При культивировании бактерии на среде с сахарозой было обнаружено три фракции левана с молекулярной массой 600–700, 190–210 кДа и с массой менее 25 кДа (рис. 3а). При

Таблица 1. Динамика изменения удельной активности левансахаразы при культивировании *A. vinelandii* на средах с мелассой и бардой

Варианты сред	Удельная активность левансахаразы, ед./мг белка				
	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч
С сахарозой	78.9 ± 4.0	68.3 ± 3.1	33.3 ± 2.1	28.3 ± 2.0	20.1 ± 1.2
С мелассой	249.6 ± 5.9	83.8 ± 2.1	27.6 ± 1.6	16.5 ± 1.0	19.0 ± 1.1
С мелассой + 5% барды	72.5 ± 3.0	61.4 ± 2.9	30.5 ± 1.7	20.0 ± 1.4	11.9 ± 0.7
С мелассой +10% барды	57.5 ± 1.4	58.3 ± 2.4	18.8 ± 1.4	11.8 ± 0.8	11.5 ± 1.4

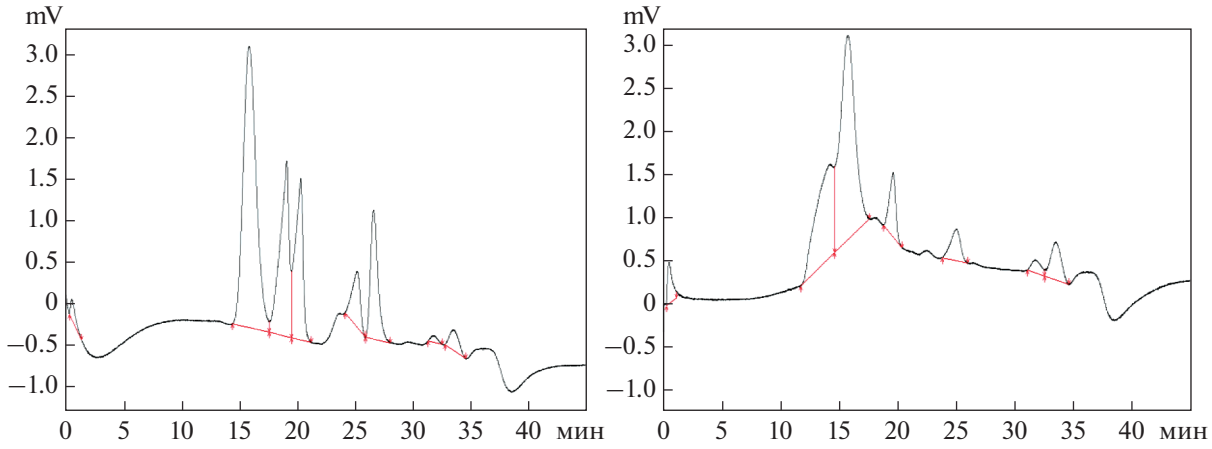

Рис. 3. Распределение по молекулярной массе левана, полученного при культивировании *A. vinelandii* на среде с сахарозой (а) и мелассой (б). (Красная линия – базовая).

культивировании бактерии на среде с мелассой была обнаружена дополнительная фракция левана с молекулярной массой более 1000 кДа (рис. 3б).

Для изучения возможности сорбции ионов важно знать особенности молекулярной структуры левана, синтезированного на среде с мелассой. С помощью ИК спектроскопии установлено, что в ИК-спектре левана наблюдались полосы, характерные для валентных колебаний гидроксильных групп (область 3700–3100 см$^{-1}$), валентных колебаний С–Н-связей метиленовых групп (3000–2800 см$^{-1}$) и их асимметричных валентных колебаний (около 2945 см$^{-1}$).

В ИК-спектрах область 1500–900 см$^{-1}$ характеризует различные колебания: С–Н-, С–О- и О–Н-гликозидной связи и глюкофуранозного кольца левана: полосы 1450 и 1430 см$^{-1}$ обусловлены деформационными плоскостными колебаниями ОН-группы, а также принадлежат колебаниям метиленовой группы (около 1429 см$^{-1}$); 900 см$^{-1}$ – асимметричным колебаниям кольца в

Таблица 2. Элементный состав левана (масс %), синтезированного при культивировании *A. vinelandii* Д-08 на средах с мелассой и бардой

Компоненты	Контроль	Меласса	Меласса + 5% барды	Меласса+ 10% барды
C	30.7 +/–0.1	32.7 +/–0.1	34.1 +/–0.4	30.2 +/–0.1
O	63.5 +/–0.1	60.2 +/–0.1	60.8 +/–0.1	61.4 +/–0.1
Na	0.0969 +/–0.1	0.0174 +/–0.1	0.0224 +/–0.1	0.186 +/–0.1
Mg	0.124 +/–0.1	0.126 +/–0.1	0.20 +/–0.1	0.273 +/–0.1
Al	0.0457 +/–0.1	0.0300 +/–0.1	0.0300 +/–0.1	0.0312 +/–0.1
Si	0.216 +/–0.1	0.106 +/–0.1	0.176 +/–0.1	0.137 +/–0.1
P	0.526 +/–0.1	0.109 +/–0.1	0.243 +/–0.1	0.530 +/–0.1
S	0.102 +/–0.1	0.0922 +/–0.1	0.27 +/–0.1	0.182+/–0.1
Cl	0.0691 +/–0.1	0.0849 +/–0.1	1.26 +/–0.1	0.0538 +/–0.1
K	0.376 +/–0.1	1.56 +/–0.1	2.77 +/–0.1	2.21 +/–0.1
Ca	3.10 +/–0.1	4.40 +/–0.1	4.233 +/–0.1	3.39 +/–0.1
Mn	0.438 +/–0.1	0.0109 +/–0.1	0.0030 +/–0.1	0.0650 +/–0.1
Fe	0.421 +/–0.1	0.132 +/–0.1	0.0101 +/–0.1	1.000 0.243 +/–0.1

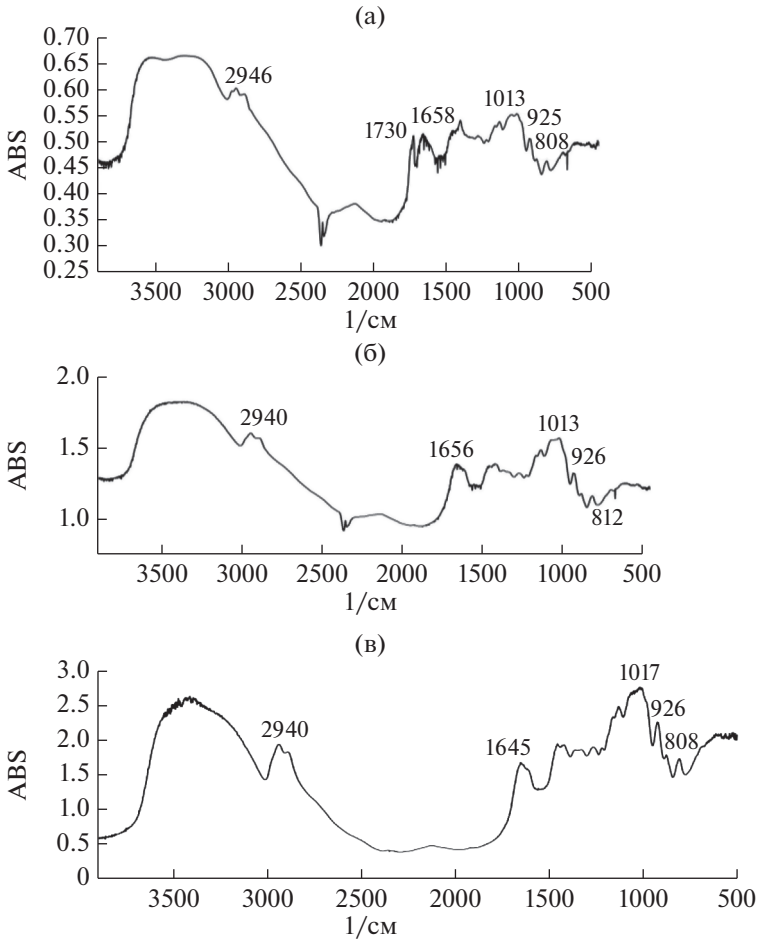

Рис. 4. ИК-спектры левана, синтезированного на среде с сахарозой (а), мелассой (б) и с мелассой + 10% барды (в).

противофазе и колебаниям атома C_1 и 4 окружающим его атомам в β-гликозидных структурах. Полоса около 800 $см^{-1}$ обусловлена CH и CH_2-маятниковыми колебаниями фруктофуранозного кольца молекулы (рис. 4) [20]. Сопоставление ИК-спектра левана данного штамма и данных ИК-спектроскопии леванов *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, видов *Halomonas* [20, 29, 30] позволяет сделать вывод о том, что образец, полученный на средах с мелассой, идентичен левану других продуцентов.

В молекуле левана, синтезированного *A. vinelandii* среде с мелассой, были выявлены изменения как гидратированности молекулы полимера, так и колебаний двойных связей молекулы (область 1800–1500 $см^{-1}$, рис. 4). Известно, что полоса с максимумом около 1640 $см^{-1}$ обусловлена деформационными колебаниями OH-групп воды и при увеличении гидратированности левана полоса смещается в область больших волновых чисел (рис. 4а). Таким образом, молекула левана, синтезированного бактериями на СК с мелассой и бардой, менее гидратирована по сравнению с леваном, синтезированном на среде с сахарозой.

В следующей серии экспериментов, с помощью РФА исследовали изменения элементного состава левана, полученного при культивировании *A. vinelandii* на разных средах (табл. 2). Установлено, что содержание углерода и кислорода в образцах, полученных при культивировании на СК с мелассой и с мелассой и бардой не менялось (30.2–34.1% и 60.2–63.5% соответственно). В то же время при культивировании бактерии на СК с мелассой в молекуле леване снижалось содержание Na, Al, S, Si, P, Mn, Fe, по сравнению с леваном, полученным на среде с сахарозой, но при этом увеличивается содержание Mg, Cl, K, Ca. При культивировании бактерий на комплексной среде (меласса + 5% барды) уменьшалось содержание Na, Al, Si, P, Ca, Mn, Fe, но увеличивается содержание Mg, S, Cl, K, по сравнению с леваном, синтезированном на среде с сахарозой. При культивировании бактерий на комплексной среде (меласса + 10% барды) уменьшалось содержа-

Таблица 3. Динамика сорбции ионов Cu и ионов Co образцами криогеля с леваном

Время	Адсорбция ионов Cu, %		Адсорбция ионов Co, %	
	Контроль	С леваном	Контроль	С леваном
5 мин	39.9 ± 1.3	44.8 ± 2.0	39.3 ± 3.4	34.1 ± 1.5
10 мин	41.4 ± 1.6	49.4 ± 0.6	42.2 ± 0.5	34.6 ± 2.0
30 мин	43.6 ± 1.9	51.7 ± 3.4	45.4 ± 3.1	35.7 ± 3.1
1 ч	44.5 ± 1.7	53.1 ± 3.6	35.6 ± 3.1	46.7 ± 1.4
2 ч	46.9 ± 3.0	55.4 ± 3.3	35.8 ± 0.9	35.9 ± 1.5
3 ч	47.3 ± 1.9	54.9 ± 0.8	37.2 ± 2.1	36.8 ± 2.9
24 ч	45.6 ± 4.4	46.9 ± 1.0	31.7 ± 2.2	37.2 ± 2.4
96 ч	43.2 ± 1.4	46.3 ± 1.4	21.1 ± 2.2	28.8 ± 2.9

Таблица 4. Динамика сорбции ионов Zn и ионов Cd образцами криогеля с леваном

Время,ч	Адсорбция ионов Zn, %		Адсорбция ионов Cd, %	
	контроль	с леваном	контроль	с леваном
5 мин	30.9 ± 1.7	31.1 ± 1.5	59.6 ± 3.3	69.9 ± 2.0
10 мин	30.3 ± 0.3	31.3 ± 0.6	60.8 ± 1.4	79.2 ± 2.2
30 мин	30.4 ± 0.4	31.3 ± 2.2	54.4 ± 2.8	62.7 ± 3.1
1	31.3 ± 0.5	31.9 ± 2.2	50.6 ± 1.1	51.9 ± 1.8
2	31.4 ± 0.1	41.7 ± 4.9	56.4 ± 1.0	66.8 ± 2.6
3	31.5 ± 0.6	37.8 ± 5.4	51.4 ± 3.3	73.3 ± 1.7
24	31.4 ± 0.2	48.1 ± 1.2	51.8 ± 2.8	78.8 ± 1.6
96	30.8 ± 1.6	34.5 ± 7.1	42.8 ± 3.9	70.8 ± 1.8

ние Al, Si, P, Cl, но увеличивалось Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe (по сравнению с леваном на среде с сахарозой. Полученные данные свидетельствуют о различном элементном составе левана, полученного при культивировании бактерий на различных сложных средах. Культивирование бактерий на комбинированной среде (особенно меласса + + 10% барды) способствовало синтезу левана с большим молекулярным весом (более 1000 кДа) и измененной молекулярной структурой: снижение вклада колебаний двойных связей и меньшая гидратированность молекулы. Вероятно, причиной этого могло быть увеличение связывания молекулой левана ионов Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe из среды.

В дальнейшем исследовали сорбционные свойства криогеля с бактериальным леваном, полученным при культивировании на различных средах с вторичными продуктами производства. Известно, что гидрогели во многом аналогичны полимерным материалам и в отличие от смол с жесткой структурой характеризуются гибкой структурой и могут пропускать гораздо больше воды. Наличие специфических функциональных групп (например, OH) в гидрогелях позволяет эффективно адсорбировать частицы на наружной поверхности, а также на внутренней поверхности их трехмерной сети [31]. Для исследования процесса адсорбции ионов Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} и Zn^{2+} к растворам солей добавляли измельченный криогель, приготовленный на основе ПВС (контроль) и ПВС с леваном (опыт). В ходе исследования показано, что все образцы были способны в разной степени к сорбции исследуемых ионов. Сорбция ионов меди в контроле достигала 47.3% в течение 3 ч, а при использовании ПВС с нативным леваном уже 57% в тече-

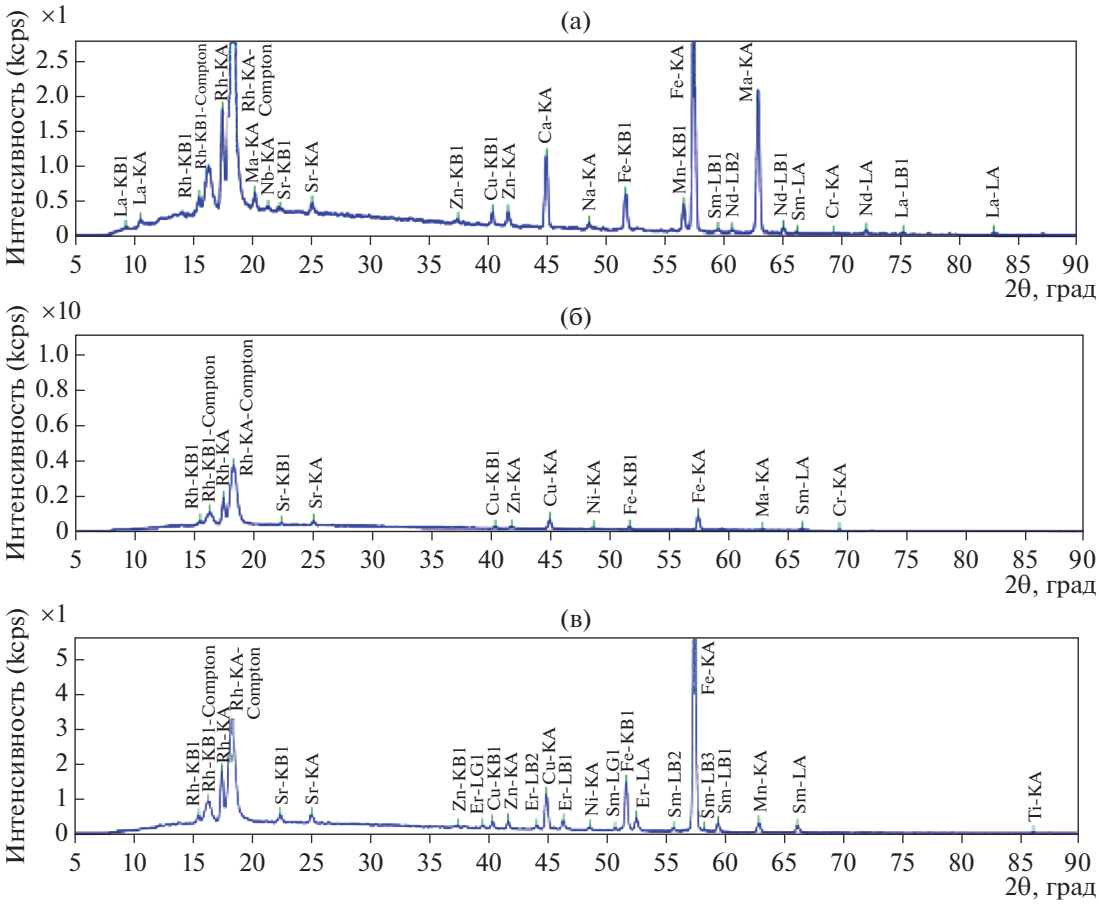

Рис. 5. РФА-спектры левана, синтезированного на среде с сахарозой (а), мелассой (б) и среде с мелассой и 10% барды (в).

ние 2 ч (табл. 3). В экспериментах с кобальтом максимальное значение сорбции в контроле наблюдали через 30 мин – 45.4%, образец с леваном максимально связывал катион через 1 ч – 46.7%. Максимальная сорбция ионов цинка приходилась на 24 ч и составляла 48.2%, в контроле значение было ниже – 33.4% на 18 ч. Эффективная сорбция ионов кадмия наблюдалась уже через 10 мин – 79.2% (табл. 4). В контроле процесс шел медленнее, и эффективность очистки от кадмия была меньше и составляла 60.8%.

Таким образом, из полученных результатов видно, что сорбция ионов меди, цинка и кадмия криогелем с леваном происходила эффективнее, чем с ПВС. Сорбция ионов меди, кобальта, цинка и кадмия достигала максимума в определенный момент времени, а после достижения равновесия процесс постепенно выходил на равновесное плато. Сорбция разных ионов криогелем с леваном имела различную динамику и амплитуду: максимальный эффект обнаружен при сорбции Cd^{2+} в течение 10 мин.

Установлено, что криогели с леваном способны сорбировать радиоактивный плутоний и уран: сорбция урана достигала 55% после двух нед. эксперимента и не достигла равновесия. Такую динамику сорбции, предположительно, можно объяснить большим радиусом гидратированного радионуклида и стерическими трудностями его абсорбции, а также отрицательным зарядом иона. Сорбция плутония происходила быстрее и достигала равновесия уже через 4 ч (40.9%).

Максимальная удельная активность левансахаразы наблюдалась при культивировании бактерии на среде с мелассой, что коррелировало и с максимальным синтезом левана. В этих условиях бактерии синтезировали высокомолекулярный леван (более 1000 кДа) с измененной молекулярной структурой (снижение вклада колебаний двойных связей и меньшая гидратированность молекулы). Все это, вероятно, обусловило увеличение связывания молекулой левана ионов Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe из среды культивирования. На основе поливинилового спирта и левана были получены криогели, способные эффективно сор-

бировать ионы меди (максимально за 1 ч), цинка (за 24 ч) и кадмия (за 10 мин), а также радиоактивные плутоний (максимально за 4 ч) и уран (максимально за 168 ч). Все это свидетельствует о возможности использования криогелей ПВС с леваном в качестве компонентов сорбентов при в очистке стоков различных предприятий от тяжелых металлов и радионуклидов. Дальнейшее обращение с сорбентами подразумевает их регенерацию с предварительной десорбцией металлов 1 н раствором соляной кислоты, поскольку известно, что леван обладает устойчивостью к нагреванию, кислотным и щелочным средам, высокой водоудерживающей способностью [21, 32]. В таком режиме возможно многократное использование биосорбентов. Окончательный этап утилизации может быть осуществлен сжиганием, что приводит к 95% сокращению объемов сорбента в виде зольного остатка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05054).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Humelnicu D., Dinu M.V., Dragan E.S.* // J. Hazard. Mater. 2011. V. 185. № 1. P. 447–455.
2. *Zhang F., Wang M., Zhou L., Ma X., Zhou Y.* // Desalination and Water Treatment. 2015. V. 54. №. 9. P. 2546–2556.
3. *Wang X., Zheng Y., Wang A.* // J. Hazard. Mater. 2009. V. 168. № 2–3. P. 970–977.
4. *Karim M.R., Aijaz M.O., Alharth N.H., Alharbi H.F., Al-Mubaddel F.S., Awual M.R.* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 169. P. 479–486.
5. *Su T. Wu L., Pan X., Zhang C., Shi M., Gao R., Qi X., Dong W.* // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 542. P. 253–262.
6. *Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., Kankane S.* // Prog. Polym. Sci. 2008. V. 33. № 11. P. 1088–1118.
7. *Myung D., Waters D., Wiseman M., Duhamel P.E., Noolandi J., Ta C.N., Frank C.W.* // Polym. Adv. Technol. 2008. V. 19. № 6. P. 647–657.
8. *Dragan E.S.* // Chem. Eng. J. 2014. V. 243. P. 572–590.
9. *Bonina P., Petrova T.S., Manolova N.* // J. Bioact. Compat. Polym. 2004. V. 19. № 2. P. 101–116.
10. *Liang S. Liu L., Huang Q., Yam K.L.* // Carbohydr. Polym. 2009. V. 77. № 4. P. 718–724.
11. *Liu J., Wang W., Wang A.* // Polym. Adv. Technol. 2011. V. 22. № 5. P. 627–634.
12. *Marsano E., Bianchi E., Vicini S., Compagnino L., Sionkowska A., Skopińska J., Wiśniewski M.* // Polymer. 2005. V. 46. № 5. P. 1595–1600.
13. *Huang D., Wang W., Kang Y., Wang A.* // J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem. 2012. V. 49. № 11. P. 971–979.
14. *Dragan E.S., Dinu M.V.* // Res. J. Chem. Env. 2013. V. 17. № 10. P. 4–10.
15. *Wang W.B., Huang D.J., Kang Y.R., Wang A.Q.* // Colloid Surf. B: Biointerfaces. 2013. V. 106. P. 51–59.
16. *Pena C., Miranda L., Segura D., Nunez C., Espin G., Galindo E.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 29. № 5. P. 209–213.
17. *Шутова В.В., Русяева А.Б.* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18. № 4. С. 455–461.
18. *Ревин В.В., Шутова В.В., Новокупцев Н.В.* // Фундаментальные исследования. 2016. № 1-1. С. 53–57.
19. *Revin V.V., Shutova V.V., Novokuptsev N.V.* // J. Biotechnol. 2016. V. 231 (Supplement). P. S8.
20. *Abdel-Fattah A.F., Mahmoud D.A.R., Esawy M.A.T.* // Current Microbiology. 2005. V. 51. №. 6. P. 402–407.
21. *Kang S.A., Jang K.H., Seo J.W., Kim K.H., Kim Y.H., Rairakhwada D., Seo M.Y., Lee J.O., Ha S.D., Kim C.-H., Rhee S.K.* Levan: Applications and Perspectives. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives / Ed. B.H.A. Rehm. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. P. 145–161.
22. *Vijn I., Smeekens S.* // Plant physiology. 1999. V. 120. № 2. P. 351–360.
23. *Revin V.V. Kostina E.G., Revina N.V., Shutova V.V.* // Braz. Arch. Biol. Techn. 2018. V. 61. P. e18160406.
24. *Бугаенко И.Ф., Штерман С.В.* Меласса (свекловичная, тростниковая, сырцовая), состав и методы анализа. М.: МГУ, 2006. 72 с.
25. Distillers Grains: Production, Properties, and Utilization / Eds. K.S. Liu., K.A. Rosentrater. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, CRC Press, 2012. 564 p.
26. *Stepanov N.A., Efremenko E.N.* // Catalysts. 2018. V. 8. P. 33–49.
27. *Ortiz-Soto M.E., Rivera M., Rudiño-Piñera E., Olvera C., López-Munguía A.* // Protein Eng. Des. Sel. 2008. V. 21. № 10. P. 589–595.
28. *Коломиец Л.Л., Пилипенко Л.А., Жмудь И.М., Панфилова И.П.* // Журн. аналит. химии. 1999. Т. 54. № 1. С. 34–36.
29. *Kucukasik F., Kazak H., Guney D., Finore I., Poli A., Yenigun O., Nicolaus B., Oner E.T.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 89. № 6. P. 1729–1740.
30. *Sarilmiser H.K., Ates O., Ozdemir G., Arga K.Y., Oner E.T.* // J. Bioscie. Bioeng. 2015. V. 119. № 4. P. 455–463.
31. *Khan M., Lo I.M.C.* // Water Res. 2016. V. 106. P. 259–271.
32. *Öner E.T., Hernández L. Combie J.* // Biotechnology Advances. 2016. V. 34. № 5. P. 827–844.

Use of Levan from *Azotobacter vinelandii* as a Component of Biosorbent of Heavy Metals and Radionuclides

V. V. Shutova[a, *], V. V. Revin[a], E. A. Kalinkina[a], A. V. Safonov[b], A. G. Savchenko[d], and G. V. Maksimov[c, d]

[a]*National Research Mordovia State University, Saransk, 430005 Russia*

[b]*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow, 119991 Russia*

[c]*Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119892 Russia*

[d]*National Research Technological University MISIS, Moscow, 119049 Russia*

**e-mail: vshutova@yandex.ru*

Azotobacter vinelandii Д-08 cultivation of on molasses and distiller's grains media increases levansaccharase activity and levan biosynthesis: the maximum specific activity of levansaccharase is found on molasses medium and correlates with the maximum synthesis of polysaccharide. It was found, that bacteria synthesized an additional fraction of high-molecular levan (more than 1000 kDa) with altered molecular structure (reduced contribution of double bond fluctuations and less hydration of the molecule), likely due to increased binding by the Na, Mg, S, K, Ca, Mn, Fe with levan molecule. The obtained cryogels based on polyvinyl alcohol and levan are able to effectively sorb ions with different dynamics: copper ions (max after 1 h), zinc (max after 24 h) and cadmium (max after 10 min), as well as radioactive plutonium (max after 4 h) and uranium (max after 168 h). All this shows the possibility of using cryogels with levan as components of sorbents in purification of effluents of various enterprises from heavy metals and radionuclides

Keywords: Levan, *Azotobacter vinelandii* D-08, adsorption, copper ions, cobalt ions, radionuclides

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 87–94

УДК 579.64

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ШТАММ БАКТЕРИЙ *Pseudomonas protegens* ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЗЛАКОВ, УСТОЙЧИВЫЙ К ГЕРБИЦИДАМ

© 2021 г. С. П. Четвериков[1, *], Д. В. Четверикова[1], М. Д. Бакаева[1], А. А. Кенджиева[1], С. Н. Стариков[1], З. Р. Султангазин[2]

[1]*Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия*

[2]*Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450059 Россия*

**e-mail: chelab007@yandex.ru*

Поступила в редакцию 20.04.2020 г.
После доработки 08.07.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Из антропогенно нарушенной почвы выделен, изучен и идентифицирован штамм бактерий *Pseudomonas protegens* ДА1.2. Показано, что изолят может использоваться в растениеводстве, так как синтезировал индолилуксусную кислоту, способствовал мобилизации фосфора из нерастворимых соединений, фиксировал атмосферный азот и проявлял антагонизм к микроскопическим грибам родов *Alternaria, Bipolaris, Botrytis, Fusarium* и *Rhizoctonia*. Штамм сохранял жизнеспособность в растворах ряда гербицидов, широко используемых для обработки посевов культурных злаков (Октапон экстра, Флоракс, Чисталан, Наномет, Спецназ и Дикамба), поэтому мог применяться в баковых смесях с этими гербицидами. В условиях светоплощадки одновременное опрыскивание растений пшеницы гербицидом и жидкой культурой *P. protegens* ДА1.2 способствовало поддержанию роста корней и побегов, нормализации содержания хлорофилла и пролина в листьях. Опыт, заложенный в 2019 г. на поле Баймакского НП БНИИСХ УФИЦ РАН, показал прибавку урожая на 19–24% после применения бактериальной культуры на фоне гербицидов Наномет и Чисталан. Полученные результаты позволяют рассматривать культуру бактерий *P. protegens* ДА1.2 как потенциальный стимулятор роста и агент для уменьшения гербицидного стресса у пшеницы.

Ключевые слова: Pseudomonas, антигрибная активность, индолилуксусная кислота, фосфатмобилизующие бактерии, устойчивость к гербицидам, гербицидный стресс, антистрессовое действие, растительно-микробное взаимодействие

DOI: 10.31857/S0555109921010220

Биологические препараты для борьбы с фитопатогенами и повышения урожайности ряда сельскохозяйственных культур пользуются стабильным спросом в растениеводстве. При этом биологические методы приходится интегрировать в сложившуюся культуру земледелия и сочетать с использованием минеральных удобрений и пестицидов. Большой интерес представляет одновременная обработка полей ростстимулирующими бактериями и гербицидами, поскольку существуют свидетельства того, что некоторые ризосферные бактерии могут повышать устойчивость растений к окислительному стрессу [1, 2].

Вопрос совместного использования гербицидов и биологических препаратов стал освещаться в научной литературе относительно недавно. В немногочисленных работах рассматривается, как правило, сочетание одного или двух гербицидов и ростстимулирующих бактерий. Например, мало чувствительные к глифосату штаммы *Azotobacter* и *Bacillus* [3], толерантный к норфлуразону штамм *Pseudomonas putida* [4], клодинафоп устойчивый штамм *Mesorhizobium* [5], пендиметалин толерантный *Azotobacter salinestris* [6] и т.д. При этом редко описывается одновременное тестирование микроорганизмов и гербицидов разных групп и не рассматриваются двухкомпонентные препараты.

В предыдущей работе [7] было показано, что среди рекомендованных для использования в растениеводстве бактериальных штаммов устойчивость к высоким дозам гербицидов не является широко распространенным свойством. В связи с этим базой для скрининга толерантных к гербицидам ростстимулирующих бактерий послужили

изолированные из различных сред культуры бактерий – деструкторов гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (**2,4-Д**). По данным литературы [8] способность к деградации 2,4-Д может также быть одним из факторов, обеспечивающих благоприятное влияние PGPR-бактерий на растения.

После предварительного тестирования в качестве объекта исследований был выбран новый штамм бактерий ДА1.2, выделенный из антропогенно нарушенной почвы возле эксплуатируемой нефтяной скважины в Уфимском районе Республики Башкортостан (Россия). Эти бактерии, способные расти на селективной среде, содержащей 2,4-Д, благоприятно влияют на проростки пшеницы в лабораторных условиях.

Цель работы – исследование свойств штамма ДА1.2, обеспечивающих его ростстимулирующую активность, и возможность его практического применения для обработки растений пшеницы в баковых смесях с гербицидами.

МЕТОДИКА

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки штамма ДА1.2, важные для его идентификации, определяли по стандартным методикам [9]. Микробиологические посевы проводили с использованием общепринятых методик. Морфологию клеток исследовали с использованием сканирующего зондового микроскопа Solver Pro-M (“NT-MTD”, Россия). Тотальную ДНК выделяли по методике, описанной в работе [10]. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F (5' AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3') и 1492R (5' ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3') на амплификаторе “My Cycler” (“Bio-Rad Laboratories”, США). Очистку ПЦР-продуктов и последующую секвенирующую ПЦР осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкциям производителя. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК проводили с использованием программ MEGA 7.0 (http://www.megasoftware.net) и Sequence Scanner v1.0. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании баз данных EzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon) и GenBank (http:/www.ncbi.nlm.nih.gov).

Устойчивость к гербицидам оценивали по способности штамма расти на минеральной среде Раймонда [11] с добавлением пептона (1 г/л) и препаратов на основе синтетических ауксинов: 10 мл/л Октапона экстра, 2.5 мл/л Флоракса, 5 мл/л Чисталана и 0.6 г/л Дикамба, и сульфонилмочевины (0.05 г/л Нанометa и 0.13 г/л Спецназа). Концентрация гербицидов в среде соответствовала их максимальному допустимому содержанию в используемых для опрыскивания растений рабочих растворах.

Для изучения способности к продукции фитогормонов бактерии культивировали в мясопептонном бульоне в колбах Эрленмейера на термостатируемом шейкере (160 об./мин) в течение 72 ч при 28°C. Перед экстракцией диэтиловым эфиром жидкую культуру бактерий центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Продукцию фитогормонов измеряли методом иммуноферментного анализа (**ИФА**) [12].

Способность к мобилизации соединений фосфора оценивали по образованию прозрачных зон вокруг колоний на среде Пиковской [13], активность нитрогеназы бактерий оценивали по способности восстанавливать ацетилен, как описано в работе [14].

Антагонизм к фитопатогенам определяли методом совместного выращивания бактерий и грибов в чашках Петри на среде Чапека [15]. В качестве тест-объектов использовали микроорганизмы: *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. ВКМ F-844, *F. gibbosum* Appel et Wollenw ВКМ F-848, *F. graminearum* Schwabe ВКМ F-1668, *F. solani* (Mart) Sacc. ВКМ F-142, *F.oxysporum* Schltdl ВКМ F-137, *F. nivale* (Fr.) Ces. Ex Sacc. ВКМ F-3106, *Alternaria alternate* (Fr.) Keissl. ВКМ F-3047, *A. solani* Sorauer ВКМ F-3048, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker ИБ Г-12, *Botrytis cirnea* Persoon ВКМ F-1573 и *Rhizoctonia solani* J.G. Kuehn ВКМ F-895. Зоны подавления и угнетения роста мицелия измеряли без учета диаметра лунки.

Для постановки лабораторных экспериментов в сосуды объемом 0.5 л, заполненные смесью песка и черноземного грунта (с. Булгаково, Республика Башкортостан) в соотношении 1 : 9, высаживали по пять проростков пшеницы мягкой сорта Кинельская юбилейная. Растения выращивали на светоплощадке при плотности потока фотонов ФАР 190 мкмоль · $м^{-2}$ · $с^{-1}$, 14-часовом фотопериоде и 22–26°C. Влажность почвы поддерживали на уровне 60–80% от полной влагоемкости. На 7 сут после появления всходов их опрыскивали гербицидом, культурой бактерий или их смесью из расчета на один сосуд 0.455 мкл Октапона экстра, 0.455 мкл Чисталана, 6.5 мкг Нанометa и 5×10^7 КОЕ штамма ДА1.2.

Полевой эксперимент был заложен в 2019 году на полях Баймакского научно-исследовательского института сельского хозяйства УФИЦ РАН (Республика Башкортостан, Россия). Обработку полей с яровой пшеницей сорта Кинельская юбилейная в фазе кущения проводили однократно в последних числах мая гербицидами Наномет (10 г/га), Чисталан (0.7 л/га), суспензией бактерий штамма ДА1.2 (2 л/га с титром 10^9 КОЕ/мл) или баковой смесью бактерий и гербицидов. Пло-

щадь каждой делянки 20 м^2, повторность вариантов трехкратная.

Содержание свободного пролина в растениях пшеницы определяли по методу [16].

Для определения содержания хлорофилла в побегах навески массой 100 мг измельчали и экстрагировали 96%-ным спиртом в течение 24 ч без доступа света. В экстрактах измеряли оптическую плотность при 665 и 649 нм. Содержание хлорофиллов a и b рассчитывали по формулам:

$$C_a = 13.7 \times D_{665} - 5.76 \times D_{649},$$

$$C_b = 25.8 \times D_{649} - 7.6 \times D_{665},$$

где C_a и C_b – концентрация хлорофиллов *a* и *b* (мг/л), D_{665}, D_{649} – значения экстинкции при соответствующей длине волны с последующим пересчетом на сырую массу образца [17]. Измерения проводили в 3 биологических и в 3 аналитических повторностях.

Данные были выражены в виде средних значений, рассчитанных с использованием MS Excel. Достоверность различий между средними показателями анализировалась с помощью *t*-критерия.

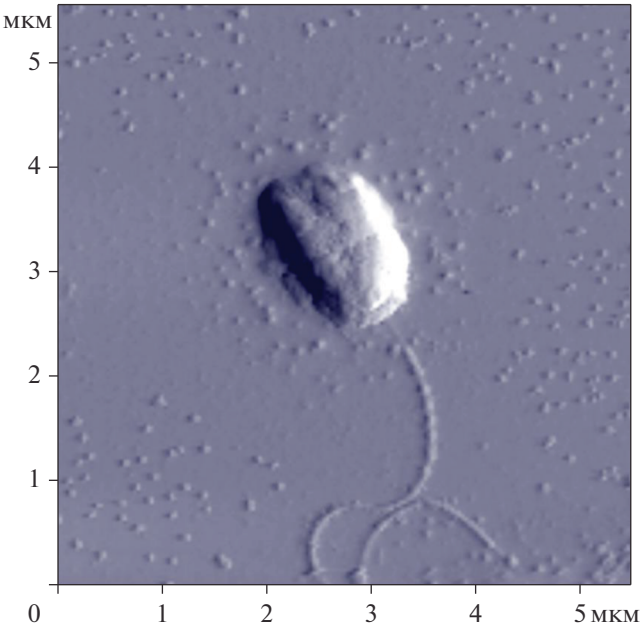

Рис. 1. Изображение клетки *P. protegens* ДА1.2, полученное в сканирующем зондовом микроскопе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки исследуемого штамма ДА1.2 – грамотрицательные подвижные палочки, размером 0.4–0.7 и 1.0–1.6 мкм (рис. 1). При выращивании на мясопептонном агаре образовывали колонии кремового цвета диаметром 2–6 мм, которые последовательно темнели до оранжевого и коричневого цвета с выделением пигмента в среду. Оптимальная температура роста составляла 28–32°C. Метаболизм – дыхательный. Штамм ДА1.2 был каталозоположителен, гидролизовал казеин, желатин, лецитин, целлюлозу и мочевину, не обладал амилазной активностью, синтезировал липолитические ферменты, образовывал аммиак из аргинина и использовал цитрат в качестве единственного источника углерода и энергии. Реакция Фогес–Проскауэра была отрицательная. При содержании 0–5% NaCl в среде наблюдался умеренный рост культуры, при 5–10% NaCl – слабый. При культивировании на среде Кинг Б образовывался желтый флуоресцирующий пигмент.

Для идентификации штамма ДА1.2 была определена нуклеотидная последовательность (1410 п.н.) гена 16S рРНК, которая депонирована в базе данных GenBank под номером MT267792. Ее сравнение с другими известными последовательностями позволило с высокой долей вероятности отнести изучаемый микроорганизм к виду *P. protegens* Ramette (обнаружено 100% сходства с типовым штаммом вида *P. protegens* CHA0(T)). Для обнаружения связей с другими видами рода *Pseudomonas* на основе данных о нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК было построено филогенетическое древо (рис. 2). На рис. 2 видно, что изучаемый штамм входит в один кластер со штаммом *P. protegens* CHA0(T).

Известно, что микроорганизмы могут продуцировать вещества, являющиеся регуляторами роста растений [18]. В культуральной жидкости *P. protegens* ДА1.2 была обнаружена индолилуксусная кислота (**ИУК**) в количестве 870 ± 44 нг/мл, что свидетельствовало о способности штамма ДА1.2 синтезировать ауксин в стационарной фазе роста культуры на средах, содержащих пептон.

Исследуемый штамм являлся диазотрофом: скорость его роста на безазотной среде Эшби лишь незначительно уступала скорости роста на мясопептонном бульоне, а активность нитрогеназы составила 21.3 нмоль C_2H_4 ч$^{-1}$ · мл$^{-1}$. Полученные данные согласовывались с известными данными для других азотфиксаторов и продуцентов ИУК [19, 20].

На 5 сут роста на среде Пиковской вокруг колоний штамма *P. protegens* ДА1.2 формировались прозрачные зоны радиусом 18 мм, что указывало на продукцию веществ, способствующих растворению трехзамещенных фосфатов.

Изучение воздействия штамма *P. protegens* ДА1.2 на фитопатогенные виды грибов показало, что микроорганизм способен проявлять антагонизм по крайней мере, к 11 видам микромицетов (табл. 1). Так, в зоне диффузии бактериальных метаболитов наблюдалось полное отсутствие мицелия грибов *A. solani*, *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. graminearum*, *A. alternata*, *B. cirnea* и

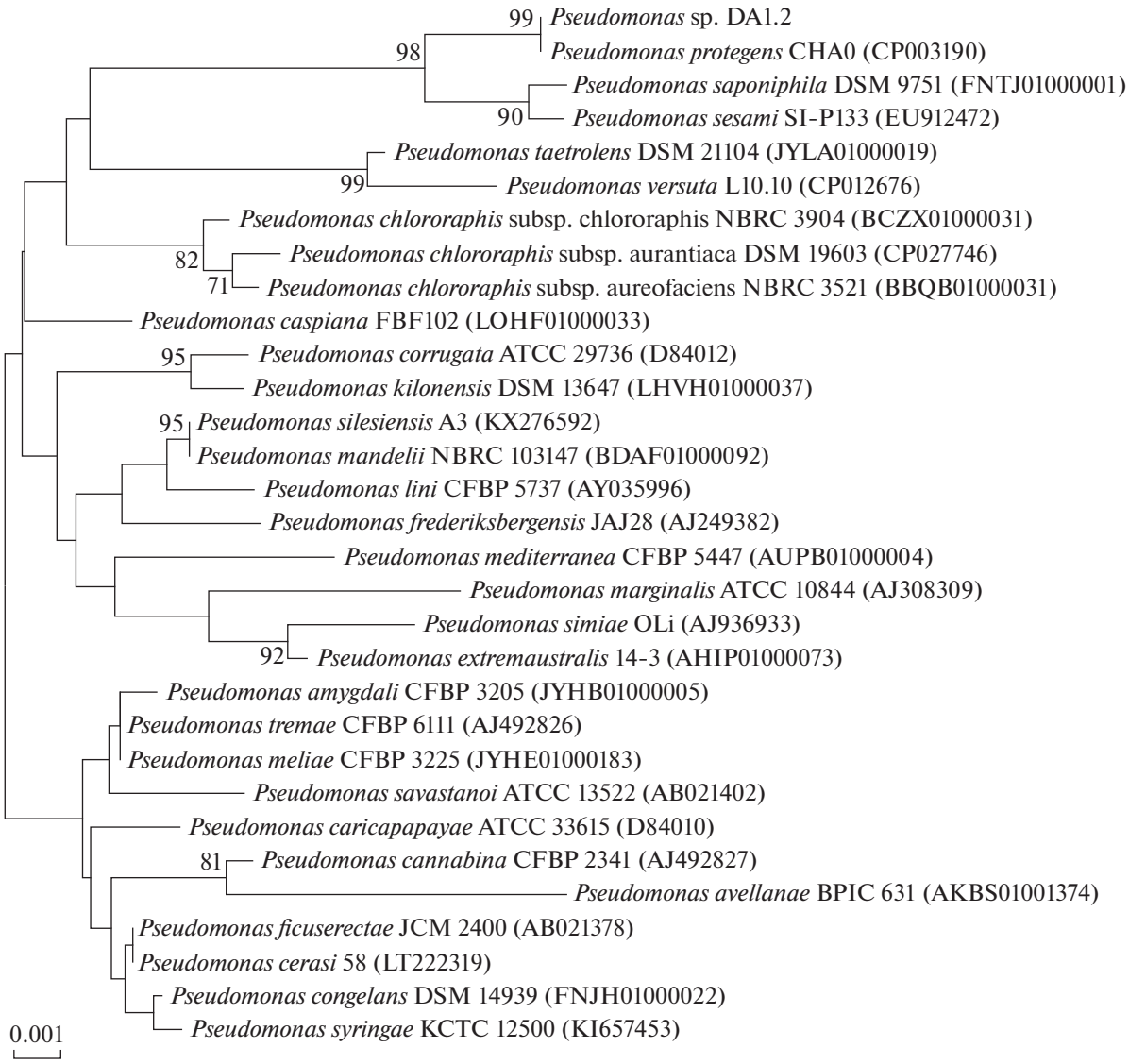

Рис 2. Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ДА1.2 согласно анализу нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (эволюционное расстояние, соответствующее 1 замене нуклеотида на каждые 1000 показано масштабом, цифры – статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа, показаны величины показателя выше 70%).

R. solani. При этом на газонах первых 3 видов микромицетов проявлялись зоны наибольшего диаметра, а воздействие на культуры *F. solani*, *F. oxysporum* и *F. nivale* выражалось, в основном, в замедлении скорости роста мицелия и угнетении спороношения.

Таким образом, исследуемые бактерии благодаря наличию ряда характерных для PGPR свойств обладали потенциалом для использования в сельском хозяйстве в качестве биоудобрений или биофунгицидов.

Штамм *P. protegens* ДА1.2 сохранял высокую скорость роста достоверно ($p < 0.05$), не отличающуюся от контроля без гербицидов, на среде, содержащей 10 мл/л Октапона экстра, 2.5 мл/л Флоракса, 5 мл/л Чисталана, 0.6 г/л Дикамба, 0.05 г/л Наномета и 0.13 г/л Спецназа. Это указывало на возможность приготовления баковых смесей с данными гербицидами без потери жизнеспособности бактерий.

Обработка в лабораторных условиях смесью бактерий и гербицида Наномет растений пшеницы приводила к достоверному ($p < 0.05$) увеличению массы побегов и корней (рис. 3). Парадоксальный эффект при использовании бактерий наблюдался на фоне применения гербицида Октапон экстра. Так, в то время как гербицид стимулировал накопление массы побегов и корней, штамм ДА1.2 способствовал приближению их к контрольным показателям, тем самым нивелируя его воздействие,

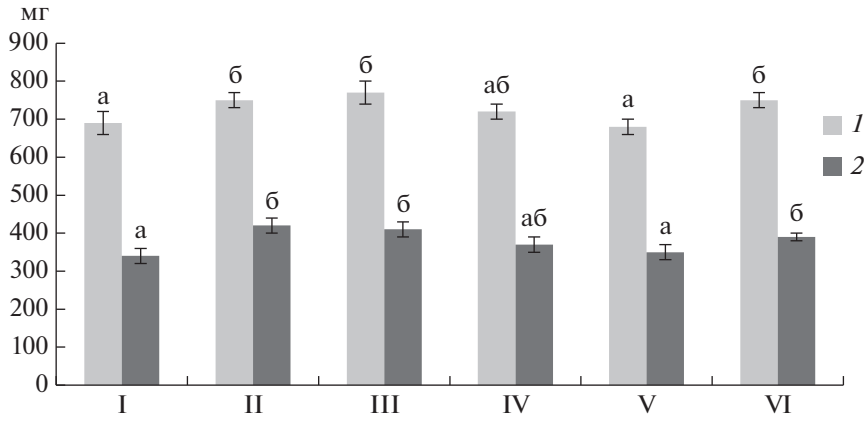

Рис. 3. Масса побегов (*1*) и корней (*2*) пшеницы при выращивании в лабораторном эксперименте: I – без гербицидов и бактерий, II – без гербицидов с бактериями, III – Октапон экстра без бактерий, IV – Октапон экстра с бактериями, V – Нанамет без бактерий, VI – Нанамет с бактериями. Группы достоверно отличающихся значений ($p \leq 0.05$, *t*-test) помечены разными буквами.

механизм которого заключается в нарушении нормального роста растений.

Накопление низкомолекулярных соединений, одним из которых является аминокислота пролин, представляет раннюю адаптивную реакцию растений на действие стрессоров различной природы. Повышение концентрации пролина в листьях пшеницы наблюдалось в ответ на разные абиотические стрессы [21, 22]. В работе было зафиксировано повышение содержания пролина в листьях пшеницы на 3 сут после опрыскивания гербицидами Октапон экстра и Нанамет (рис. 4). Накопление пролина не было значительным в случае дополнительного введения бактерий ДА1.2. Аналогичный эффект от воздействия бактерий был отмечен при стрессе, индуцированном гербицидом паракват [23].

Содержание хлорофилла является другим важным показателем состояния растений в условиях стресса [24]. Высокая концентрация хлорофилла характерна для здоровых растений, поскольку связана с большей эффективностью фотосинтеза. Было показано, что обработка бактериями способствовала увеличению содержания хлорофилла в листьях пшеницы, как в случае применения гербицидов, так и в контроле, без них (рис. 5). Таким образом, взаимодействие пшеницы с ростстимулирующими бактериями носило антистрессовый характер и улучшало состояние растений по сравнению с необработанными аналогами.

Таблица 1. Антагонистическая активность штамма *P. protegens* ДА1.2 по отношению к фитопатогенным микромицетам

Вид фитопатогенного гриба	Диаметр зоны отсутствия роста гриба, мм	Диаметр зоны угнетения роста гриба, мм
Alternaria alternata	35 ± 2	–
A. solani	42 ± 2	–
*Bipolaris sorokiniana**	40 ± 1	–
Botrytis cirnea	34 ± 2	–
Fusarium culmorum	40 ± 3	–
F. gibbosum	32 ± 1	–
F. graminearum	32 ± 1	–
F. nivale	2 ± 1	22 ± 1
F. solani	6 ± 2	42 ± 2
F. oxysporum	10 ± 2	36 ± 2
Rhizoctonia solani	37 ± 2	48 ± 3

* Вид гриба, который является местным изолятом и хранится в Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

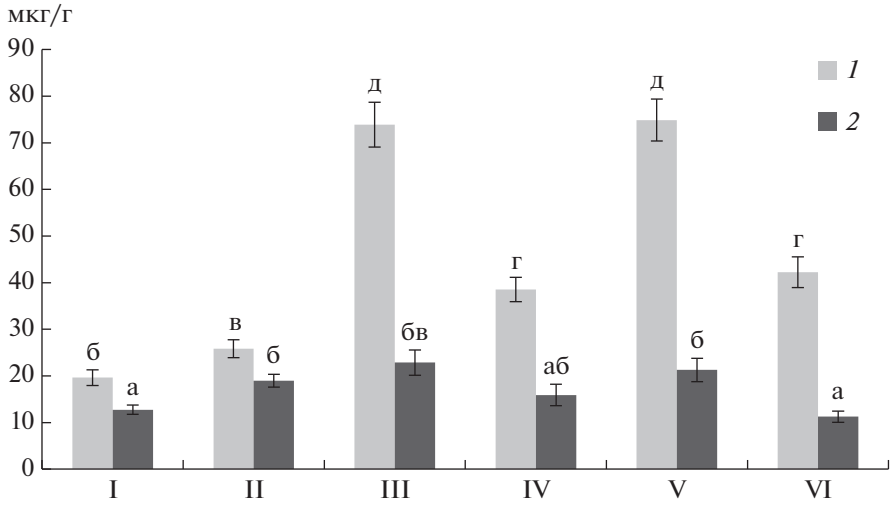

Рис. 4. Содержание пролина в листьях пшеницы на 3 (*1*) и 11 (*2*) сут в условиях лабораторного эксперимента: I – без гербицидов и бактерий, II – без гербицидов с бактериями, III – Октапон экстра без бактерий, IV – Октапон экстра с бактериями, V – Нанамет без бактерий, VI – Нанамет с бактериями. Группы достоверно различающихся значений ($p \leq 0.05$, *t*-test) помечены разными буквами.

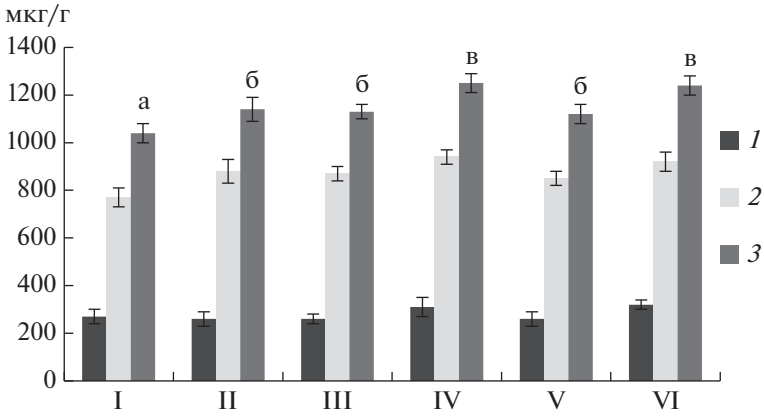

Рис. 5. Содержание хлорофилла a (*1*), хлорофилла b (*2*) и суммарного хлорофила (*3*) в листьях пшеницы в условиях лабораторного эксперимента: I – без гербицидов и бактерий, II – без гербицидов с бактериями, III – Октапон экстра без бактерий, IV – Октапон экстра с бактериями, V – Нанамет без бактерий, VI – Нанамет с бактериями. Группы достоверно различающихся значений ($p \leq 0.05$, *t*-test) помечены разными буквами.

В условиях полевого эксперимента было изучено влияние однократного опрыскивания бактериями штамма ДА1.2 и гербицидами Октапон экстра, Нанамет и Чисталан на накопление надземной массы и урожайность яровой пшеницы сорта Кинельская юбилейная (рис. 6). Отмечена общая тенденция к увеличению массы побегов и количества собранного зерна на делянках, обработанных культурой бактерий. При этом использование штамма ДА1.2 и гербицидов Нанамет и Чисталан оказывало синергетический эффект на урожайность, по-видимому, вследствие одновременного уменьшения засоренности и снижения уровня стресса у растений пшеницы. Влияние гербицида Октапон экстра на рост пшеницы и ее урожайность было неоднозначным. Несмотря на меньшую зеленую массу, количество зерна, собранного с этих делянок, было выше, чем в контроле. Можно предположить, что это объясняется особенностями роста корневой системы и формирования колоса, которые в данном опыте не отслеживались.

Микробиологический посев отобранных на делянках ризосферных почвенных образцов на минеральную среду Раймонда, содержащую 2,4-Д в качестве единственного источника углерода, показал, что через 1 мес после обработки участков штаммом *P. protegens* ДА1.2 численность бактерий – деструкторов данного соединения увеличивалась до $(1.5 \pm 0.3) \times 10^5$ КОЕ/г по сравнению с

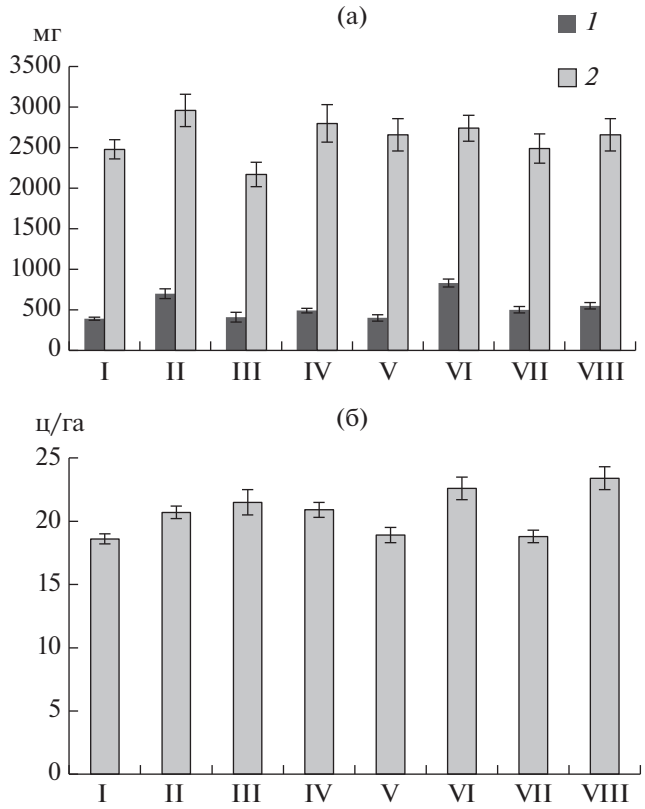

Рис. 6. Масса побегов (а) в июне (*1*) и июле (*2*) и урожайность (б) пшеницы сорта Кинельская юбилейная при выращивании в полевых условиях: I – без гербицидов и бактерий, II – без гербицидов с бактериями, III – Октапон экстра без бактерий, IV – Октапон экстра с бактериями, V – Нанамет без бактерий, VI – Нанамет с бактериями, VII – Чисталан без бактерий, VIII – Чисталан с бактериями.

участками без обработки бактериями, на которых этот показатель составил (4.2 ± 0.5) × 10^3 КОЕ/г. Это может служить косвенным признаком наличия живых клеток *P. protegens* ДА1.2 в почве и их участия в эффектах, наблюдаемых на посевах пшеницы после применения баковых смесей бактерий и гербицидов.

Таким образом, в результате проведенных исследований было доказано наличие ряда полезных признаков у штамма *P. protegens* ДА1.2, к которым относились биосинтез ауксинов, мобилизация неорганических фосфатов, антагонизм к фитопатогенным грибам, нитрогеназная активность, а также его ростстимулирующее и антистрессовое влияние на растения пшеницы. Показано, что одновременная обработка растений пшеницы гербицидами Октапон экстра, Нанамет, Чисталан и штаммом *P. protegens* ДА1.2 может давать положительный эффект, отличающийся от применения отдельно бактерий и гербицидов. Использование баковых смесей гербицидов и ростстимулирующих бактерий может стать полезным приемом при возделывании злаковых культур и заслуживает детального изучения.

Авторы выражают благодарность Р.Р. Гарафутдинову (ИБГ УФИЦ РАН) за помощь при проведении сканирующей зондовой микроскопии.

Работа выполнена в рамках Гос. задания Минборнауки России (проект № 075-00326-19-00) по теме № АААА-А19-119021390081-1 с использованием оборудования РЦКП УФИЦ РАН “Агидель”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abd El-Daim I.A., Bejai S., Meijer J.* // Plant Soil. 2014. V. 379. № 1–2. P. 337–350. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2063-3
2. *Kaushal M., Wani S.P.* // Agric. Ecosyst. Environ. 2016. V. 231. P. 68–78. https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.031
3. *Ahemad M., Khan M.S.* // Ann. Microbiol. 2010. V. 60. P. 735–745. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0124-2
4. *Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O.* // Analele Univ. din Oradea, Fasc. Biol. 2018. V. 25. № 2. P. 74–83.
5. *Ahemad M., Khan M.S.* // Pestic. Biochem. Physiol. 2010. V. 98. № 2. P. 183–190. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.06.005
6. *Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H.* Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability. V. 7. / Ed. D. Panpatte, Y. Jhala, H. Shelat, R. Vyas. Singapore: Springer, 2018. P. 23–43. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7146-1_2.
7. *Четвериков С.П. Четверикова Д.В., Кенджиева А.А., Бакаева М.Д.* // Естественные и технические науки. 2019. № 11. С. 108–111. https://doi.org/10.25633/ETN.2019.11.18
8. *Jacobsen C.S.* // Plant Soil. 1997. V. 189. № 1. P. 139–144. https://doi.org/10.1023/A:1004296615446
9. Методы общей бактериологии / Ред. Ф.М. Герхардт. М: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
10. *Wilson K.* Current Protocols in Molecular Biology. / Eds. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl N.Y.: Green Publishing Associates, 2003. P. 241–245.
11. *Raymond R.L.* // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
12. *Veselov S.Y., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Guili-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M.* // Physiol. Plant. 1992. V. 86. № 1. P. 93–96. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x
13. *Пиковская Р.И.* // Микробиология. 1948. Т. 17. № 5. С. 362–370.
14. *Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Мухаматдьярова С.Р., Логинов О.Н.* // Изв. Самарского научн. центра РАН. 2013. № 3-5. С. 1637–1640.
15. *Четвериков С.П., Логинов О.Н.* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 4. С. 479–483. (*Chetverikov S.P., Loginov O.N.* // Microbiology. 2009. V. 78. № 4. P. 428–432.)

16. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* // Plant Soil. 1973. V. 39. № 1. P. 205–207. https://doi.org/10.1007/BF00018060
17. Патент РФ. 2003. № 2244916.
18. *Tsukanova K.A., Chebotar V.K., Meyer J.J.M., Bibikova T.N.* // S. Afr. J. Bot. 2017. V. 113. P. 91–102. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007
19. *Samavat S., Samavat S., Mafakheri S., Shakouri M.J.* // Bulg. J. Agric. Sci. 2012. V. 18. № 3. P. 387–395.
20. *Bakaeva M., Kuzina E., Vysotskaya L., Kudoyarova G., Arkhipova T., Rafikova G., Chetverikov S., Korshunova T., Chetverikova D., Loginov O.* // Plants. 2020. V. 9. № 3. Article 379. https://doi.org/10.3390/plants9030379
21. *Mwadzingeni L., Shimelis H., Tesfay S., Tsilo T.J* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Article 1276. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01276
22. *Kolupaev Y.E., Yastreb T.O., Oboznyi A.I., Kirichenko V.V., Ryabchun N.I.* // Russian J. Plant Physiology. 2016. V. 63. № 3. P. 326–337. https://doi.org/10.1134/S1021443716030067
23. *Agafonova N.V., Doronina N.V., Trotsenko Y.A.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. № 2. P. 199–204. https://doi.org/10.1134/S0003683816020022
24. *Ashraf M., Harris P.J.C.* // Photosynthetica. 2013. V. 51. № 2. P. 163–190. https://doi.org/10.1007/s11099-013-0021-6

Promising Herbicide – Resistant Bacterial Strain Pseudomonas Protegens for Stimulating the Agricultural Cereal Grains Growth

S. P. Chetverikov[a, *], D. V. Chetverikova[a], M. D. Bakaeva[a], A. A. Kenjieva[a], S. N. Starikov[a], and Z. R. Sultangazin[b]

[a] *Ufa Institute of Biology – a Separate Structural Division of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

[b] *Bashkir Research Institute of Agriculture – a Separate Structural Division of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450059 Russia*

**e-mail: chelab007@yandex.ru*

Bacterial strain *Pseudomonas protegens* DA1.2 was isolated from anthropogenic disturbed soil, studied and identified. The isolate has potential for use in crop production: it synthesizes indolylacetic acid, promotes the mobilization of phosphorus from insoluble compounds, has nitrogenase activity, and shows antagonism against microscopic fungi from the genera *Alternaria, Bipolaris, Botrytis, Fusarium*, and *Rhizoctonia*. The strain remains viable in herbicides (Octapon extra, Florax, Chistalan, Nanomet, Spetsnaz, Dicamba) solutions widely used for processing crops of cultivated cereals, and can be used in tank mixtures contaning these herbicides. In the light site, simultaneous spraying the wheat plants with herbicide and liquid culture *P. protegens* DA1.2 stimulate the roots and shoots growth, normalize the chlorophyll and proline content in the leaves. Field experience built in 2019 on the field of the Baymak SD BRIA UFRC RAS, showed an 1–24% increase in yield after the use of bacterial culture against the background of herbicides Nanomet and Chistalan. The results obtained allow us to consider the culture of *P. protegens* DA1.2 as a potential growth stimulator and agent for cupping herbicide stress in wheat.

Keywords: Pseudomonas, antifungal activity, indolylacetic acid, phosphatomobilizing bacteria, herbicide resistance, herbicide stress, anti-stress effect, plant-microbial interaction

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 1, с. 95–104

УДК 602.4:628.35:664

БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ПОСЛОЙНО ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

© 2021 г. В. А. Арляпов[1], Н. Ю. Юдина[1], А. В. Мачулин[2], В. А. Алферов[1], О. Н. Понаморева[1], А. Н. Решетилов[2, *]

[1]*Тульский государственный университет, Тула, 300012 Россия*

[2]*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия*

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

Поступила в редакцию 28.05.2020 г.
После доработки 28.08.2020 г.
Принята к публикации 02.09.2020 г.

Разработан новый подход к формированию рецепторных элементов биосенсоров для определения биохимического потребления кислорода (**БПК**) путем послойной иммобилизации микроорганизмов. Созданы биорецепторные элементы БПК-биосенсоров на основе выделенных из активного ила бактериальных микроорганизмов *Paracoccus yeei, Pseudomonas veronii* и *Bacillus proteolyticus*. Рецепторный элемент был представлен слоями, каждый из которых содержал клетки одного вида. Аналогичный послойный элемент формировали из дрожжевых клеток *Ogataea angusta*, *Blastobotrys adeninivorans, Debaryomyces hansenii.* В обоих случаях клетки иммобилизовали в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. Послойная иммобилизация приводила к повышению чувствительности как дрожжевых, так и бактериальных биосенсоров, что по-видимому, объяснялось отсутствием конкуренции за субстрат внутри слоя и его большей доступностью к каждому из них. Изучено влияние pH, ионной силы, соединений тяжелых металлов в анализируемых пробах на окислительную активность разработанных рецепторных элементов. Определены аналитические и метрологические характеристики биосенсоров. Нижняя граница определяемых значений $БПК_5$ для биосенсора на основе микроорганизмов активного ила составила 0.5 $мгO_2/дм^3$, а для биосенсора на основе дрожжей – 0.7 $мгO_2/дм^3$. Проведено определение $БПК_5$ образцов воды с использованием разработанных рецепторных элементов. Использование обоих рецепторных элементов позволяло получать результаты с высокой степенью совпадения со стандартным методом. Такие биосенсорные анализаторы могут рассматриваться как прототипы опытных образцов приборов.

Ключевые слова: биосенсор, биохимическое потребление кислорода ($БПК_5$), поливиниловый спирт, N-винилпирролидон, ассоциации микроорганизмов, послойная иммобилизация

DOI: 10.31857/S0555109921010207

В условиях современного интенсивного промышленного производства значительно возросла нагрузка на объекты окружающей среды, что выразилось существенным её загрязнением органическими соединениями. В этой связи возрастающее внимание уделяется экспресс-методам контроля, ориентированным на оценку совокупного воздействия токсикантов на окружающую среду [1]. Одним из параметров, определяющим интегральную загрязненность воды, является индекс биохимического потребления кислорода (**БПК**). Стандартная методика определения БПК требует инкубирования насыщенной кислородом пробы в течение 5 или 20 сут ($БПК_5$ или $БПК_{20}$) [2]. В соответствии с мировой практикой эффективным подходом для экспресс-оценки БПК является разработка биосенсоров на основе микроорганизмов, окисляющих широкий круг органических веществ [3]. Для создания биораспознающих элементов БПК-сенсоров используют либо чистые культуры микроорганизмов с определенными потребительскими свойствами (широкий спектр окисляемых субстратов, устойчивость к воздействию негативных факторов окружающей среды), либо ассоциации микроорганизмов (искусственные ассоциации, активный ил) [1, 4].

Использование ассоциаций микроорганизмов позволяет существенно расширить спектр окисляемых субстратов и, соответственно, правильность определения БПК. В то же время БПК-биосенсоры на основе ассоциаций микроорганизмов могут иметь недостаточную стабильность, причи-

ной которой является изменение состава ассоциации с течением времени [5]. Для увеличения числа окисляемых субстратов при сохранении воспроизводимости ответов биосенсора могут быть использованы искусственные ассоциации микроорганизмов, состоящие чаше всего не более чем из 2 или 3 штаммов [3]. Это приводит к расширению субстратной специфичности и стабилизации функционирования сенсора в течение длительного периода времени. Так, в работе [6] для создания БПК-биосенсора использована ассоциация микроорганизмов *Trichosporon cutaneum* и *Bacillus subtilis.* Биосенсор был применен для определения БПК в озерной воде и коммунальных стоках и имел время жизни более 40 сут. В работах [7, 8] использованы микроорганизмы *Bacillus licheniformis*, *Dietzia maris* и *Marinobacter marinus*, выделенные из морской воды. Описанный биосенсор мог устойчиво функционировать до 10 мес. и был успешно использован для анализа образцов морской воды. В работе [9] описан микробный биотопливный элемент (**БТЭ**) для экспресс-определения БПК на основе ассоциации шести культур: *Thermincola carboxydiphila, Pseudomonas aeruginosa, Ochrobactrum intermedium, Shewanella frigidimarina, Citrobacter freundii* и *Clostridium acetobutylicum.* БТЭ позволял проводить определение $БПК_5$ в диапазоне 8–240 мг/дм^3, что непригодно для анализа поверхностных вод, $БПК_5$ в которых колеблется от 1 до 4 мг/дм^3.

БПК – биосенсоры, основанные на сложной микробной популяции, такой, например, которая имеется в активном иле, имеют наилучшую способность к детекции широкого спектра субстратов, однако из-за нестабильности консорциума в течение времени такие биосенсоры дают наименее воспроизводимые результаты. Предложено несколько решений данной проблемы. Так, возможно проведение периодической калибровки биосенсора [1], использование убитого прогреванием препарата активного ила [10] или применение биопленок на основе активного ила или других естественных сообществ [11–13]. Однако, неудобство в работе и техническая сложность данных методов заставляют отказаться от таких подходов.

Несмотря на имеющееся описание БПК-биосенсоров на основе искусственных и природных ассоциаций микроорганизмов в подавляющем большинстве исследований отмечается их невысокая стабильность, а также недостаточная воспроизводимость и чувствительность анализа. В настоящей работе для решения данной проблемы предложена послойная иммобилизация микробных клеток, которая позволяет уменьшить конкуренцию микроорганизмов за субстраты, что приведет к повышению стабильности и чувствительности биораспознающих элементов. Ранее аналогичный подход был эффективно использован для иммобилизации ферментов [14, 15]. Предполагается, что такой способ может быть эффективен и в случае микроорганизмов.

Цель работы – разработка и определение характеристик амперометрического БПК-биосенсора кюветного типа на основе послойно иммобилизованных искусственных и природных ассоциаций микроорганизмов.

МЕТОДИКА

Получение поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. Для получения поливинилового спирта (**ПВС**), модифицированного N-винилпирролидоном, использовали 5% водной раствор ПВС марки № 16/1 (“Прайм Кемикалс Групп”, Россия), водный раствор аммоний-церий (IV) нитрата $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$ (ТУ 6-09-4762-84, Россия) в качестве инициатора и N-винилпирролидон (99%, “Acros Organics”, США) в качестве сшивающего агента. Модификацию проводили при постоянном перемешивании в атмосфере азота при температуре 40°C [16].

Изучение структуры геля сканирующей электронной микроскопией. Анализ образцов ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, содержащих клетки микроорганизмов, проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510 LV (“JEOL”, Япония) в режиме высокого вакуума при регистрации вторичных электронов.

Культивирование клеток микроорганизмов. Штаммы дрожжей *Ogataea angusta* ВКМ Y-1397, *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 и *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677 были получены во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Клетки бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ B-3302, *Bacillus proteolyticus* TD42^T и *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T были выделены из активного ила очистных сооружений города Тулы [17].

Бактерии культивировали на жидкой глюкозопептонной питательной среде, следующего состава (г/л): глюкоза – 10, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 0.5 (“Диаэм”, Россия). Дрожжи *O. angusta* ВКМ Y-1397 культивировали на жидкой дрожжевой питательной среде, следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 0.1, лейцин – 0.034, глицерин – 1.66, микроэлементы – 0.2 (“Sigma”, США).

Клетки культивировали аэробно 18–20 ч в качалочных колбах объемом 750 см^3 при температуре 29°C. Полученную биомассу отделяли центрифугированием при комнатной температуре при 10000 g 10 мин (центрифуга TG16WS, “Поликом”, Россия). Осадок промывали 20 мМ фосфатным буферным раствором, pH 6.8 (или 7.6 для дрожжей *O. angusta* ВКМ Y-1397), ресуспендиро-

вали в буферном растворе и распределяли по микропробиркам типа Eppendorf, центрифугировали на центрифуге “Eppendorf” (Германия) 5 мин при 10000 g. Промытую биомассу хранили при температуре – 25°C в микропробирках.

Иммобилизация микроорганизмов в гидрогель модифицированного поливинилового спирта. Для создания биочувствительных элементов на основе бактериальных и дрожжевых штаммов проводили послойную иммобилизацию микроорганизмов в гидрогеле ПВС, модифицированном N-винилпирролидоном. Для получения биокатализатора к 100 мкл гидрогеля добавляли 20 мг клеток микроорганизмов. Равномерного распределения клеток в гидрогеле добивались встряхиванием смеси на центрифуге Sky line Elmi Centrifuge & Vortex CM70M (“ELMI”, Латвия) в течение 5 мин. Полученную суспензию переносили в планшет (d = = 5 мм) и оставляли на 2 ч при 18–22°C. Далее аналогично готовили гидрогель с другими микроорганизмами и наносили полученную суспензию вторым слоем. После нанесения трех слоев геля с клетками рецепторный элемент оставляли на воздухе до полного высыхания. Толщина полученного рецепторного элемента составляла 0.1 мм, а толщина каждого отдельного слоя – около 0.03 мм. Высохший биорецепторный элемент фиксировали на поверхности электрода Кларка с помощью нейлоновой сетки.

Проведение биосенсорных измерений. Электрохимические измерения проводили с использованием анализатора “ЭКСПЕРТ-009" ("Эконикс-Эксперт”, Россия), сопряженного с персональным компьютером, работающим под управлением специализированного программного обеспечения EXP2PR (“Эконикс-Эксперт”, Россия). Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов (мг/дм^3 · с). Преобразователями являлись кислородные электроды типа Кларка, содержащие иммобилизованные клетки микроорганизмов. Измерения выполнялись в кювете объемом 5 мл. Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буферный раствор (pH = 6.8), суммарная концентрация солей в котором составляла 20 мМ. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (200 об./мин). В качестве модельной использовали смесь глюкозы и глутаминовой кислоты в массовом соотношении 1 : 1 (ГГС), которую применяют как стандарт в определении БПК$_5$ в России [18] и международной практике (ISO 5815-1:2019). В соответствии с нормативной документацией принимали, что БПК$_5$, равное 205 мг/дм^3, соответствует раствору, содержащему 150 мг/дм^3 глюкозы и 150 мг/дм^3 глутаминовой кислоты (БПК$_5$ = 0.68 × $C_{ггс}$).

Определение параметров роста микроорганизмов. Интенсивность роста оценивали по оптической плотности среды. Измерения оптической плотности (**ОП**) каждые 2 ч в течение 3 сут проводили на фотометре Эксперт-003 (“Эконикс-Эксперт”, Россия) при длине волны 590 нм и толщине кюветы 1 см относительно кюветы с дистиллированной водой. По полученным зависимостям ОП от времени были построены кривые роста микроорганизмов.

Определение БПК$_5$ стандартным методом разбавления. В качестве референтного метода для определения БПК$_5$ был использован метод разбавления. Анализ проводили в соответствии с методикой, указанной в ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97 [18]. Определение содержания растворенного кислорода в исследуемых пробах выполняли амперометрическим методом в соответствии со стандартной методикой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка рецепторных элементов БПК-биосенсора на основе послойной иммобилизации микроорганизмов в химически модифицированный ПВС. Ранее нами была показана принципиальная возможность создания рецепторного элемента БПК-биосенсора включением ассоциации дрожжевых микроорганизмов в гель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном [19]. Биосенсор на основе ассоциации дрожжей *O. angusta, B. adeninivorans* и *D. hansenii* обладал широким спектром окисляемых субстратов и был успешно использован при создании БПК-биосенсора. Однако микробный состав данной ассоциации начинал существенно изменяться после 20 сут функционирования, что существенно затрудняло практическое использование биосенсора на такой основе. Предположили, что решением данной проблемы может быть послойная иммобилизация используемых микроорганизмов, которая позволит снизить конкурентные взаимодействия между микроорганизмами и замедлить вытеснение медленно растущих штаммов со временем (рис. 1). В работе [17] было произведено выделение и идентификация микроорганизмов активного ила очистных сооружений. Отдельные штаммы микроорганизмов были успешно использованы для формирования медиаторного БПК-биосенсора. Возможно, что использование нескольких микроорганизмов активного ила, иммобилизованных послойно, позволит создать биокатализатор, моделирующий окислительные свойства активного ила, используемого в стандартном методе анализа БПК, но обладающего высокой стабильностью состава во времени.

В качестве носителя для иммобилизации клеток в настоящей работе был использован гидрогель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном. Носитель обладает высокой химической

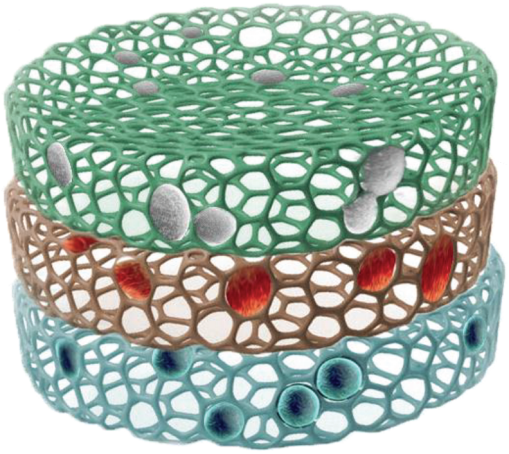

Рис. 1. Схема послойной иммобилизации дрожжевых микроорганизмов *Ogataea angusta, Blastobotrys adeninivorans, Debaryomyces hansenii* в гель ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном.

и микробиологической стабильностью, нетоксичен, биосовместим и может быть эффективно использован для иммобилизации как дрожжевых [16, 19] так и бактериальных микроорганизмов [20].

Для разработки рецепторного элемента биосенсора, обладающего высокой чувствительностью, необходимо использовать микроорганизмы с максимальной окислительной активностью. Важным фактором, влияющим на активность микроорганизмов, является время культивирования. Для выбора оптимального времени культивирования используемых бактерий и дрожжей была проанализирована зависимость окислительной активности клеток, составляющих рецепторный элемент, от времени роста (рис. 2). В табл. 1 представлены сводные данные по ростовым параметрам используемых микроорганизмов и оптимальному времени их культивирования.

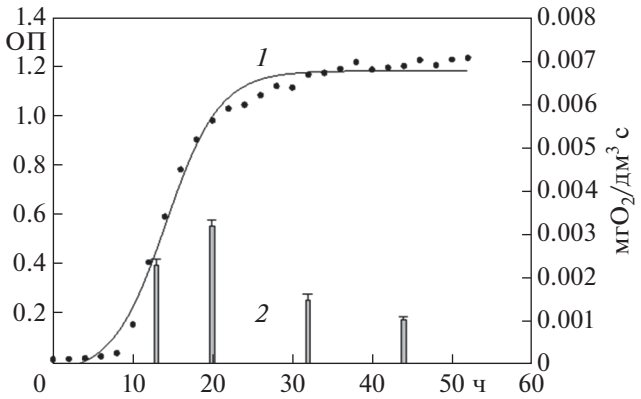

Рис. 2. Кривая роста бактерий *Bacillus proteolyticus* (ОП, *1*), полученная фотометрическим методом и зависимость окислительной активности бактерий (мг O_2/дм^3 с, *2*) от времени роста (в качестве субстрата использован раствор ГГС в концентрации 500 мг/дм^3).

Сравнивая кривые роста, можно отметить, что бактерии *P. yeei* и дрожжи *D. hansenii* имели наиболее длительную лаг-фазу (16 и 18 ч соответственно), в отличие от штаммов *P. veronii и B. proteolyticus,* для которых лаг-фаза составила всего 6 ч. Бактерии имели непродолжительные фазы экспоненциального и линейного роста и уже к 20–26 ч после посева достигали фазы замедления роста. У дрожжей фазы роста более длительны. Наибольшую окислительную активность, измеренную с использованием биосенсорного подхода, бактерий *P. yeei, P. veronii* и *B. proteolyticus* наблюдали в начале фазы замедления роста на 26, 28 и 20 ч соответственно. У дрожжей наибольшая активность по отношению к ГГС наблюдали в начале и середине фазы линейного роста. Для дальнейшей работы были отобраны микроорганизмы, культивируемые до времени наибольшей окислительной активности (табл. 1).

Структуры полученных послойной иммобилизацией рецепторных элементов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 3).

В результате модификации поливинилового спирта N-винилпирролидоном формируется гидрогель сетчатой структуры, размер пор которого варьировался от 1 до 3 мкм (рис. 3). При включении в матрицу бактериальных клеток (диаметр бактерий активного ила 0.5–1.0 мкм) или дрожжей (диаметр 2–4 мкм) происходило их равномерное распределение по всему объему носителя. На рис. 3б показано, что после проведения процесса иммобилизации дрожжи *D. hansenii* включены в состав матрицы, а сама матрица имела достаточно пористую структуру, что способствовало доступу кислорода и органических веществ к клеткам и выведению продуктов метаболизма. Таким образом, полученная матрица с послойно иммобилизован-

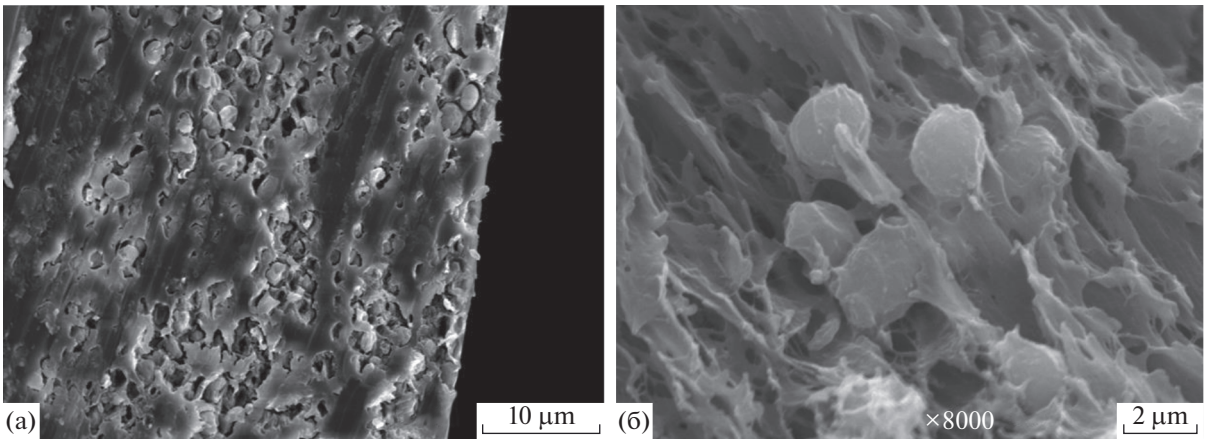

Рис. 3. СЭМ фотографии рецепторных элементов, полученных послойной иммобилизацией дрожжевых микроорганизмов в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. а – рецепторный элемент до нанесения на электрод в разрезе; б – матрица модифицированного ПВС с иммобилизованными микроорганизмами после набухания в буферном растворе (показан слой с дрожжами *D. hansenii*).

ными с микроорганизмами могла быть эффективно использована для создания БПК-биосенсора.

Определение влияния негативных факторов на окислительную способность созданных послойных биокатализаторов. Сточные воды промышленных предприятий могут содержать не только органические соединения, окисляемые микроорганизмами в составе биорецептора, но и неорганические вещества, оказывающие негативное влияние на окислительную активность микроорганизмов. Поэтому при разработке биосенсора для определения БПК важным является изучение влияния негативных факторов окружающей среды на его работу. Для биорецепторов на основе двух послойно иммобилизованных ассоциаций микроорганизмов было исследовано влияние pH среды, ионной силы и ионов тяжелых металлов на окислительную активность.

Показано, что максимальный ответ биосенсоров на основе всех сформированных биорецепторных элементов наблюдался в интервале pH 6.6–7.2, что было приемлемым для анализа большинства образцов воды (рис. 4). Влияние ионной силы среды и некоторых ионов тяжелых металлов на выбранные микроорганизмы представлено в табл. 2.

В ходе эксперимента была исследована способность клеток окислять ГГС при различных концентрациях NaCl (от 0.5 до 25%). Из данных литературы известно, что дрожжи *D. hansenii* и *B. adeninivorans* относятся к галотолерантным видам дрожжей, что подтверждается полученными результатами. Снижение окислительной активности ассоциации дрожжей на 61% при солености среды, составляющей 10%, по-видимому, связано с чувствительностью дрожжей *O. angusta* к присутствию соли. Бактерии активного ила не обла-

Таблица 1. Фазы роста и время достижения максимальной окислительной активности исследуемых микроорганизмов

Штамм	Лаг-фаза, ч	Экспоненциальная фаза, ч	Фаза линейного роста, ч	Фаза замедления роста, ч	Стационарная фаза, ч	Время максимальной активности, ч
O. angusta *BKM Y-1397*	0–12	12–16	16–30	30–38	38–50	20
B. adeninivorans BKM Y-2677	0–10	10–14	14–28	28–34	34–50	16
D. hansenii BKM Y-2482	0–18	18–24	24–26	26–30	30–50	24
P. yeei BKM B-3302	0–16	16–22	22–26	26–32	32–52	26
P. veronii DSM 11331^{T}	0–6	6–12	12–20	20–36	36–52	28
B. proteolyticus TD42^{T}	0–6	6–12	12–20	20–32	32–52	20

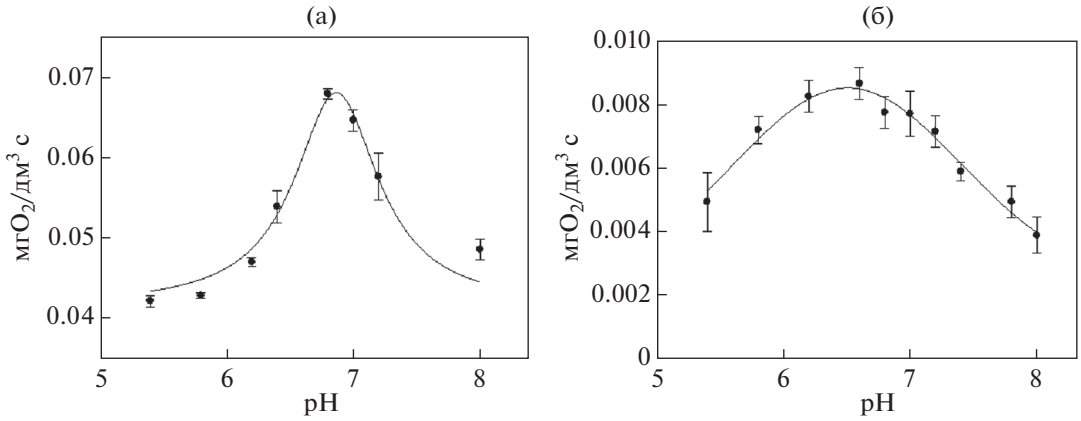

Рис. 4. Зависимость окислительной активности биокатализаторов (мг O_2/дм^3 с) на основе послойно иммобилизованных микроорганизмов от pH среды: а – рецепторный элемент на основе дрожжей *O. angusta*, *B. adeninivorans, D. hansenii;* б – рецепторный элемент на основе бактерий *P. yeei, P. veronii и B. proteolyticus.*

дают эффективной системой регуляции внутриклеточного осмотического давления. Использование полученного рецепторного элемента для определения БПК воды с повышенным содержанием солей нежелательно. Ассоциация дрожжей подвержена более сильному влиянию ионов тяжелых металлов, чем отдельный штамм *D. hansenii* [16], что может быть связано с наблюдаемым резким снижением дыхательной активности дрожжей *O. angusta* и *B. adeninivorans*. Наибольшее влияние на дыхательную активность иммобилизованных бактерий активного ила оказывало присутствие ионов $Cr_2O_7^{2-}$ и Fe^{3+}. Необходимо отметить, что бактерии активного ила гораздо сильнее подвержены влиянию условий окружающей среды, чем ассоциация дрожжей, что необходимо учитывать при практической реализации экспресс-анализатора БПК. Рецепторный элемент на основе бактерий активного ила не подойдет для практического использования, например, при анализе морской воды или сточных вод металлургических комбинатов.

Определение характеристик БПК-биосенсора на основе разработанного рецепторного элемента. При разработке рецепторного элемента биосенсора для определения БПК предпочтительно ис-

Таблица 2. Влияние состава исследуемых проб на окислительную способность иммобилизованных микроорганизмов

Ион металла (ПДК)	Снижение ответа биосенсора, %			
	на основе ассоциации бактерий активного ила		на основе ассоциации дрожжей	
	10 ПДК	100 ПДК	10 ПДК	100 ПДК
Cu^{2+} (0.001 мг/дм^3)	45 ± 3	48 ± 7	6 ± 1	51 ± 4
Pb^{2+} (0.006 мг/дм^3)	36 ± 2	41 ± 6	51 ± 3	88 ± 7
Zn^{2+} (0.01 мг/дм^3)	31 ± 2	59 ± 8	3 ± 1	64 ± 5
Ni^{2+} (0.01 мг/дм^3)	24 ± 2	48 ± 5	26 ± 2	88 ± 6
Fe^{3+} (0.1 мг/дм^3)	33 ± 3	73 ± 8	24 ± 1	75 ± 7
$Cr_2O_7^{2-}$ (0.02 мг/дм^3)	54 ± 4	71 ± 8	15 ± 1	74 ± 8
Bi^{3+} (0.1 мг/дм^3)	43 ± 3	56 ± 5	24 ± 1	75 ± 5
Co^{2+} (0.1 мг/дм^3)	39 ± 3	47 ± 5	19 ± 2	66 ± 3
Массовая доля NaCl, %	Влияние NaCl на окислительную активность биоматериала			
5	64 ± 7		39 ± 2	
10	100		61 ± 3	
20	100		67 ± 4	

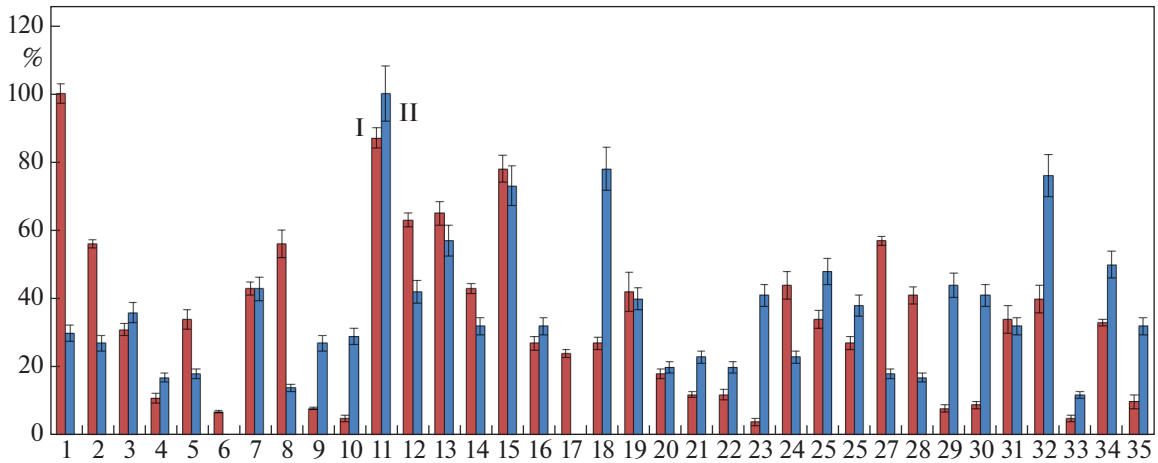

Рис. 5. Субстратная специфичность биосенсоров на основе ассоциации дрожжей (I), микроорганизмов активного ила (II), иммобилизованных в матрицу ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном (концентрация субстратов 0.04 моль/дм^3): 1 – метанол, 2 – этанол, 3 – пропанол-1, 4 – бутанол-1, 5 – 2-метилпропанол-1, 6 – 2-метилпропанол-2, 7 – 3-метилбутанол-1, 8 – пропантриол-1,2,3, 9 – сорбит, 10 – ксилоза, 11 – глюкоза, 12 – галактоза, 13 – манноза, 14 – фруктоза, 15 – сахароза, 16 – лактоза, 17 – метаналь, 18 – метановая кислота, 19 – этановая кислота, 20 – этандиовая кислота, 21 – пропандиовая кислота, 22 – лимонная кислота, 23 – ЭДТА, 24 – бензоат калия, 25 – 4-нитрофенол, 26 – 2,4-динитрофенол, 27 – глицин, 28 – серин, 29 – глутамин, 30 – тирозин, 31 – аспаргиновая кислота, 32 – глутаминовая кислота, 33 – аргинин (солянокислый), 34 – ДДС натрия, 35 – ДДБС натрия.

пользовать клетки микроорганизмов, обладающие широкой субстратной специфичностью. Широкая субстратная специфичность при этом является преимуществом, так как приводит к повышению точности результатов анализа БПК.

В работе была проведена оценка субстратной специфичности созданных послойной иммобилизацией рецепторных элементов по 35 субстратам, относящимся к различным классам органических соединений. В качестве субстратов были выбраны преимущественно легкоокисляемые органические вещества, попадание которых в водоемы приводит к существенному снижению уровня растворенного кислорода и дальнейшей эвтрофикации водных экосистем. На рис. 5 приведены результаты исследования субстратной специфичности биосенсора на основе созданных рецепторных элементов.

Оба рецепторных элемента созданных послойной иммобилизацией окисляли вещества всех представленных классов органических соединений: спирты, углеводы, карбоновые кислоты, аминокислоты, нитрофенолы и поверхностно-активные вещества, которые могут быть обнаружены в сточных водах. Ценным с практической точки зрения был факт наличия ответов на додецилсульфат натрия, додецилбензосульфат натрия (компоненты моющих средств) и нитрофенолы (распространенные промышленные токсиканты), а также отсутствие токсического действия данных субстратов при кратковременном воздействии на иммобилизованные бактерии и дрожжи. Ассоциация дрожжевых микроорганизмов не способна окислять метаналь и трет-бутанол, в отличие от ассоциации бактерий активного ила, которая окисляла все протестированные субстраты. Однако, в целом спектр окисляемых субстратов обоих используемых биорецепторов намного шире аналогов (10 субстратов) [21] и сопоставим с ранее разработанным рецепторным элементом на основе смеси микроорганизмов (33 субстрата) [19]. Полученные результаты позволяют предположить, что при определении БПК$_5$ в образцах воды различного происхождения (промышленные, бытовые, синтетические сточные воды) можно получить высокую степень корреляции между показаниями созданных биосенсоров и стандартным методом.

Для разработанных биосенсоров были получены градуировочные зависимости отклика биосенсора от БПК$_5$ в измерительной кювете (рис. 6).

Биорецепторы на основе целых клеток микроорганизмов являются рецепторами каталитического типа, так как биологический ответ в таких системах обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов. В связи с этим зависимости, приведенные на рис. 6, хорошо аппроксимируются уравнением типа Михаэлиса-Ментен:

$$R = \frac{R_{\max}[S]}{K_{\text{M}} + [S]},$$

где $R_{\max}$ – максимальная скорость потребления кислорода иммобилизованными микроорганизмами, достигаемая при $[S] \to \infty$, K_{M} – эффективная константа Михаэлиса, то есть концентрация субстрата, при которой $R = R_{\max}/2$.

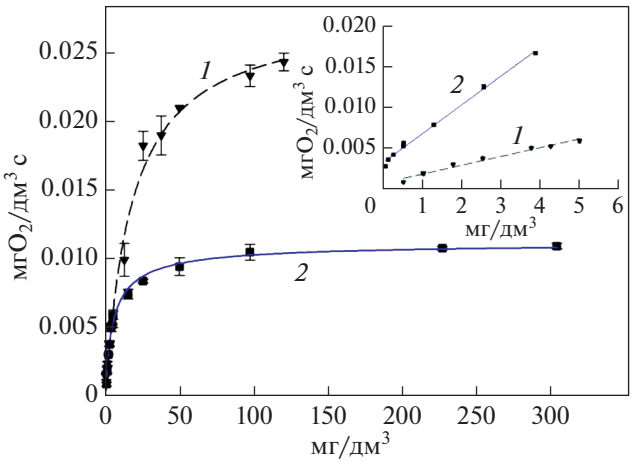

Рис. 6. Зависимость ответов (мг O_2/дм^3 с) разработанных биосенсоров от БПК$_5$: *1* – ассоциация дрожжей, *2* – микроорганизмы активного ила.

Для снижения ошибок анализа, как правило, ограничиваются использованием линейного участка градуировочной зависимости, ограниченного сверху константой K_M. Нижняя граница линейного участка соответствует нижней границе определяемых значений БПК$_5$. Она рассчитывалась статистическим методом, исходя из критерия значения относительного стандартного отклонения результатов измерения ($S_r(C)$) < 0.33. В табл. 3 представлены основные аналитические и метрологические характеристики созданных биосенсоров в сравнении с аналогами. Определение характеристик разработанного биосенсора проводили с использованием модельной смеси ГГС.

Таким образом, использование подхода послойной иммобилизации для дрожжей *O. angusta*, *B. adeninivorans*, *D. hansenii* позволило улучшить основные характеристики биосенсора, по сравнению с аналогом на основе смешанных культур [19]. Так, нижняя граница определяемых величин БПК$_5$ снизилась в 3.5 раз, а стабильность во времени выросла с 17 сут до 34. Некоторое снижение верхней границы определяемых концентраций БПК$_5$ в данном случае не является серьезным недостатком, так как БПК анализируемой пробы всегда может быть снижено путем ее разбавления. Разработанный БПК-биосенсор на основе послойно иммобилизованных микроорганизмов активного ила превосходит известные аналоги [22, 23] на порядки по чувствительности, не уступает по времени определения и операционной стабильности, но отличается более узким диапазоном определяемых содержаний БПК.

Анализ образцов воды. Проведен анализ образцов воды с использованием разработанных биосенсоров и стандартным методом разбавления. В качестве проб были взяты сточные воды городских очистных сооружений, отобранные на разных стадиях очистки, сточные воды пищевого комбината, природные воды, в том числе вода из прудов и реки в пределах городской зоны. Отбор проб и определение БПК$_5$ стандартным методом разбавления проводили согласно действующим в РФ нормативным документам [18]. При определении БПК$_5$ образцов сточных вод с использованием разработанного биосенсора пробы предварительно разбавляли. Величина разбавления подбиралась таким образом, чтобы ответ сенсора находился внутри линейного участка калибро-

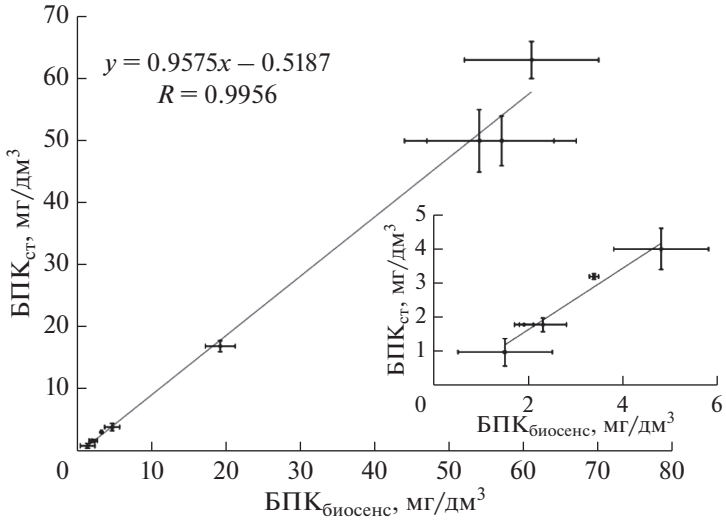

Рис. 7. Корреляция данных, полученных стандартным методом (БПК$_{ст}$, мг/дм^3) и с помощью биосенсора на основе бактерий активного ила (БПК$_{биосенс}$, мг/дм^3), послойно иммобилизованных в гидрогель модифицированного ПВС (на врезке – начальный участок корреляционной зависимости).

Таблица 3. Основные характеристики БПК-биосенсоров на основе разработанных послойной иммобилизацией рецепторных элементов

Характеристика	Микроорганизмы активного ила (послойно)	Ассоциация дрожжей (послойно)	Ассоциация дрожжей [19]	Активный ил [22]	Активный ил [23]
Диапазон определяемых значений $БПК_5$, мг O_2/дм^3	0.51–3.80	0.7–21	2.4–80	25–200	2–64
Коэффициент чувствительности × 10^{-5}, $с^{-1}$	120 ± 20	70 ± 4	10 ± 2	–	–
Долговременная стабильность, сут	52	34	17	30	60
Операционная стабильность, % (n = 15)	9.5	6.6	8.9	5.0	2.1
Время анализа, мин	5–12	5–12	5–7	5–15	–

вочной зависимости (табл. 3). На рис. 7 показана корреляция между значениями БПК, определенными с помощью биосенсора на основе послойно иммобилизованных бактерий активного ила и значениями БПК, определенными стандартным методом разбавления.

Таким образом, значения $БПК_5$, определенные с помощью созданных биосенсоров совпадали со значениями $БПК_5$, полученными по стандартной методике с учетом доверительного интервала. Для биосенсора на основе послойно иммобилизованных дрожжей коэффициент корреляции составил $R = 0.9992$, для послойно иммобилизованных микроорганизмов активного ила $R = 0.9956$. Корреляция со стандартным методом для созданных биосенсоров выше, чем для большинства описанных ранее аналогов [1, 24, 25].

Таким образом, разработан новый подход к формированию рецепторных элементов БПК-биосенсоров, состоящий в послойной иммобилизации микроорганизмов в биорецепторе. Показано, что использование такого подхода и для дрожжей *O. angusta*, *B. adeninivorans*, *D. hansenii* позволило улучшить основные характеристики биосенсора, по сравнению с аналогом на основе смешанных культур. Эффект улучшения основных характеристик биосенсора может объясняться отсутствием внутрислоевой конкуренции за субстрат и облегченной доступности к каждому из клеточных слоев. Разработанный БПК-биосенсор на основе послойно иммобилизованных микроорганизмов активного ила *P. yeei*, *P. veronii* и *B. proteolyticus* превосходил известные аналоги на порядки по чувствительности, не уступал по скорости анализа и операционной стабильности. Биосенсоры на основе обоих рецепторных элементов обладали высокой чувствительностью и позволяют анализировать образцы воды категории “чистая”. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанных биосенсорных анализаторов как прототипов опытных образцов приборов для серийного применения.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства образования и науки РФ № FEWG-2020-008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B.* // Water Res. 2014. № 49. P. 62–82.
2. *Готовцев А.В., Данилов-Данильян В.И., Никаноров А.М.* // Водные ресурсы. 2012. Т. 39. № 5. С. 510–520.
3. *Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 5–15.
4. *Abrevaya X.C., Sacco N.J., Bonetto M.C., Hilding-Ohlsson A., Cortón E.* // Biosen. Bioelectron. 2014. V. 63. P. 580–590.
5. *Rodriguez-Mozaz S.L., López de Alda M.J., Barcelo D.* // Analyt. Bioanalytical. Chem. 2006. V. 386. № 4. P. 1025–1041.
6. *Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S.* // Biosen. Bioelectron. 2003. V. 18. № 8. P. 1023–1029.
7. *Lin L., Xiao L.-L., Huang S., Zhao L., Cui J.-S., Wang X.-H., Chen X. N.* // Biosen. Bioelectron. 2006. V. 21. № 9. P. 1703–1709.
8. *Jiang Y., Xiao L.-L., Zhao L., Chen X., Wang X., Wong K.-Y.* // Talanta. 2006. V. 70. № 1. P. 97–103.
9. *Hsieh M-C, Chung Y-C.* // Environ. Technol. 2014. V. 35. № 17. P. 2204–2211.
10. *Tan T.C., Lim E.W.C.* // Sens. Act. B. 2005. V. 107. № 2. P. 546–551.
11. *Bonetto M.C., Sacco N.J., Ohlsson A.H., Cortón E.* // Talanta. 2011. V. 85. № 1. P. 455–462.
12. *Liu C., Li Z., Jiang D., Jia J., Zhang Y., Chai Y., Cheng X., Dong S.* // Sensing and Bio-Sensing Research. 2016. V. 8. P. 8–13.

13. *Jordan M.A., Welsh D.T., Peter R.* // Water Res. 2010. V. 44. № 20. P. 5981–5988.
14. *Liu D-M., Dong C.* // Process Biochem. 2020. V. 92. P. 464–475.
15. *Guedidi S., Yurekli Y., Deratani A., Déjardin P., Innocent C., Altinkaya S. A., Yemenicioglu A.* //J. Membr. Sci. 2010. V. 365. №. 1-2. P. 59-67.
16. *Arlyapov V.A., Yudina N. Yu., Asulyan L.D., Alferov S.V., Alferov V.A., Reshetilov A.N.* // Enzyme Microb. Technol. 2013. № 53. P. 257–262.
17. *Харькова А.С., Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетилов А.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 2. С. 199–209.
18. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации ($БПК_{полн}$) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. М.: 1997. 25 с.
19. *Yudina N.Yu., Arlyapov V.A., Chepurnova M.A., Alferov S.V., Reshetilov A.N.* // Enzyme Microb. Technol. 2015. V. 78. P. 46–53.
20. *Алферов С.В., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 637–643.
21. *Commault A.S., Lear G., Bouvier S., Feiler L., Karacs J., Weld R.J.* // Biochem. Eng. J. 2016. V. 109. P. 88–95.
22. *Chen J., Zhang L., Wang J.* // Biomed. Environment. Scie. 2007. V. 20. № 1. P. 78.
23. *Liu L., Zhai J., Zhu C., Gao Y., Wang Y., Han Y., Dong S.* // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 63. P 483–489.
24. *Zaitseva A.S., Arlyapov V.A., Yudina N.Yu., Alferov S.V., Reshetilov A.N.* // Enzyme Microb. Technol. 2017. V. 98. P. 43–51.
25. *Raud M., Tenno T., Jogi E., Kikas T.* // Enzyme Microb. Technol. 2012. V. 4–5. № 50. P. 221–226.

A biosensor on the Basis of Microorganisms Immobilized in Layer-by-Layer Films for Determination of Biochemical Oxygen Demand

V. A. Arlyapov[a], N. Yu. Yudina[a], A. V. Machulin[b], V. A. Alferov[a], O. N. Ponamoreva[a], and A. N. Reshetilov[b, *]

[a] *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Tula State University, Tula, 300012 Russia*
[b] *G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Acadmey of Sciences – separate subdivision of Federal Research Center Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences (PSCBR RAS), Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*
**e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru*

To determine biochemical oxygen demand (BOD), a new approach has been developed for the formation of the recognition elements of biosensors by using immobilization of microorganisms in layer-by-layer films. A bioreceptor of BOD-biosensors have been fabricated on the basis of bacterial microorganisms *Paracoccus yeei, Pseudomonas veronii* and *Bacillus proteolyticus* isolated from activated sludge. The recognition element was formed by using layer-by-layer deposition technique; each layer contained the cells of one species. Similar multilayered recognition element was created on the basis of yeast cells of *Ogataea angusta*, *Blastobotrys adeninivorans, Debaryomyces hansenii.* In both cases, the cells were immobilized into hydrogel of polyvinyl alcohol which was modified by N-vinyl pyrrolidone. It was found that layer-by-layer immobilization increases the sensitivity of both the yeast-and bacterial cell-based biosensors. It was surmised that this is due to the lack of competition for a substrate within the layer and the ability of the substrate to access more easily to each of the cell layers. The effects of the composition of the assayed samples (pH, ionic strength, heavy metal compounds) on oxidative activity of the developed recognition elements) have been investigated. Analytical and metrological characteristics of biosensors have been defined. A low limit of the estimated BOD_5 values was 0.5 mgO_2/dm^3 and 0.7 mgO_2/dm^3 for bacterial- and yeast cell-based biosensors, respectively. Determination of BOD_5 in water samples was carried out by using the fabricated recognition elements. It was shown that the use of these two bioreceptors provides an opportunity to obtain data which have a high correlation with those obtained by traditional method and biosensing analyzers might act as prototype pilot model of the devices

Keywords: biosensor, biochemical oxygen demand (BOD_5), polyvinyl alcohol, N-vinyl pyrrolidone, association of microorganism, immobilization in layer-by-layer films