# СОДЕРЖАНИЕ

## Том 56, номер 2, 2020


Системы секреции бактериальных фитопатогенов и мутуалистов (обзор)
*Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко* 107

Биочип для одновременной идентификации генов бета-лактамаз и карбапенемаз, обуславливающих устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам
*М. Ю. Рубцова, М. М. Уляшова, Ю. И. Поболелова, Г. В. Преснова, А. М. Егоров* 123

Действие $Hg^{2+}$ на HydSL гидрогеназу пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS
*Н. А. Зорин, А. С. Стародубов, А. А. Цыганков* 135

Выделение в гомогенном состоянии конститутивных изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы и исследование их характеристик
*А. Т. Еприцев, Д. Н. Федорин* 141

Вторичные метаболиты сибирских штаммов грибов *Heterobasidion annosum* sensu lato
*Т. В. Антипова, В. П. Желифонова, Ю. А. Литовка, И. Н. Павлов, Б. П. Баскунов, А. А. Тимофеев, А. Г. Козловский* 147

Влияние белого фосфора на выживаемость, протеом и клеточную морфологию *Aspergillus niger*
*А. З. Миндубаев, С. В. Кузнецова, В. Г. Евтюгин, А. Г. Даминова, Т. В. Григорьева, Ю. Д. Романова, В. А. Романова, В. М. Бабаев, Д. Н. Бузюрова, Э. В. Бабынин, Е. К. Бадеева, С. Т. Минзанова, Л. Г. Миронова* 156

Изучение деградации N-фенил-2-нафтиламина бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*
*Л. Е. Макарова, А. С. Мориц, Н. А. Соколова, И. Г. Петрова, А. А. Семенов, Л. В. Дударева, М. С. Третьякова, А. В. Сидоров* 165

Влияние лектинов азоспирилл на активность аскорбатпероксидазы и содержание аскорбиновой кислоты в корнях проростков пшеницы при абиотических стрессах
*С. А. Аленькина, В. Е. Никитина* 174

Усиление донором оксида азота холодоиндуцированных изменений антиоксидантной и осмопротекторной систем злаков
*Ю. Е. Колупаев, Е. И. Горелова, Т. О. Ястреб, Н. И. Рябчун, А. М. Резник* 182

Антибактериальная и иммуномодулирующая активность наночастиц серебра на модели экспериментального туберкулеза мышей
*О. В. Калмантаева, В. В. Фирстова, Н. С. Грищенко, Т. И. Рудницкая, В. Д. Потапов, С. Г. Игнатов* 190

Иммобилизация микробных клеток на полимерных матрицах, модифицированных плазменной обработкой
*О. И. Гулий, В. В. Симаков, О. А. Караваева, А. В. Смирнов* 198

Памяти Константина Георгиевича Скрябина (1948–2019) 206

# CONTENTS

**Vol. 56, No. 2, 2020**

Secret Systems of Bacterial Phytopathogens and Mutualists (Review)
*L. A. Lomovatskaya and A. S. Romanenko* 107

Biochip For Simultaneous Identification of Beta-Lactamase and Carbapenemase Genes Conferring the Bacterial Resistance to Beta-Lactam Antibiotics
*M. Yu. Rubtsova, M. M. Ulyashova, Yu. I. Pobolelova, G. V. Presnova, and A. M. Egorov* 123

The Effect $Hg^2$ on HydSL Hydrogenase of Purple Sulfur Bacteria *Thiocapsa roseopersicina* BBS
*N. A. Zorin, A. S. Starodubov, and A. A. Tsygankov* 135

Purification in a Homogeneous State of Constitutive Isoenzymes of Succinate Dehydrogenase from the Scutellum of Mays and the Study of Their Characteristics
*A. T. Eprintsev and D. N. Fedorin* 141

Secondary Metabolites of the Siberian Strains *Heterobasidion annosum* sensu lato
*T. V. Antipova, V. P. Zhelifonova, Yu. A. Litovka, I. N. Pavlov, B. P. Baskunov, A. A. Timofeev, and A. G. Kozlovsky* 147

The Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology and Proteome of *Aspergillus niger*
*A. Z. Mindubaev, S. V. Kuznetsova, V. G. Evtyugin, A. G. Daminova, T. V. Grigoryeva, Y. D. Romanova, V. A. Romanova, V. M. Babaev, D. N. Buzyurova, E. V. Babynin, E. K. Badeeva, S. T. Minzanova, and L. G. Mironova* 156

Studying N-phenyl-2-naphthylamine Degradation by Bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*
*L. E. Makarova, A. S. Morits, N. A. Sokolova, I. G. Petrova, A. A. Semenov, L. V. Dudareva, M. S. Tretyakova, and A. V. Sidorov* 165

Effect of Azospirillum Lectins on Ascorbate Peroxidase Activity and Ascorbic Acid Content in Wheat Seedling Roots Exposed to Abiotic Stresses
*S. A. Alen'kina and V. E. Nikitina* 174

Nitrogen Oxide Donor Enhances Cold-Induced Changes in Antioxidant and Osmoprotective Systems of Cereals
*Yu. E. Kolupaev, E. I. Horielova, T. O. Yastreb, N. I. Ryabchun, and A. M. Reznik* 182

Antibacterial and Immunomodulating Activity of Silver Nanoparticles on Mice Experimental Tuberculosis Model
*O. V. Kalmantaeva, V. V. Firstova, N. S. Grishchenko, T. I. Rudnitskaya, V. D. Potapov, S. G. Ignatov* 190

Immobilization of Microbial Cells on Polymeric Matrices Modified by Plasma Treatment
*O. I. Guliy, V. V. Simakov, O. A. Karavaeva, and A. V. Smirnov* 198

In memory of Konstantin Georgievich Skryabin (1948–2019) 206

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 107–122

УДК 581.1:633.358:577.13

# СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ И МУТУАЛИСТОВ (ОБЗОР)

© 2020 г. Л. А. Ломоватская[1], А. С. Романенко[1, *]

[1]Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: rom@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 01.04.2019 г.
После доработки 09.09.2019 г.
Принята к публикации 01.10.2019 г.

В настоящее время у бактерий выделяют девять систем секреции белков через клеточные мембраны, существенно различающиеся по сложности функционирования. Большинство данных о таких системах получено на патогенах животных, тогда как фитопатогенам, и, тем более, мутуалистическим видам бактерий посвящены лишь отдельные работы, не дающие общего представления об их роли в реализации вирулентности, а также их сходстве и различиях с аналогичными системами у бактериальных патогенов животных. В обзоре представлено современное состояние исследований о структурных и функциональных особенностях систем секреции фитопатогенов и мутуалистов, а также их значение в подавлении фитоиммунитета.

*Ключевые слова:* системы секреции, фитопатогены, микросимбионты, субстраты секреции

**DOI:** 10.31857/S0555109920020105

Все прокариоты независимо от их структурных особенностей и специализации секретируют белки через клеточные мембраны [1, 2]. Для бактерий этот процесс важен, так как значительное количество их белков, в том числе большинство факторов вирулентности локализованы вне цитоплазмы [3]. В настоящее время у бактерий выделяют девять систем секреции, существенно различающиеся по структуре и сложности функционирования [2, 4]. На рис. 1 изображены основные компоненты семи сигнальных систем, поскольку только они пока обнаружены у фитопатогенов и мутуалистов.

Основные исследования бактериальных систем секреции выполнены на патогенах животных [3], и это вполне объяснимо, поскольку познание механизмов патогенности позволяет находить новые средства борьбы с ними. В тоже время соответствующие системы транспорта факторов вирулентности фитопатогенов и мутуалистических бактерий изучены значительно хуже, и им посвящены лишь отдельные работы [5, 6], не дающие представления о роли систем секреции в реализации вирулентности патогенов растений, их сходстве и различиях с аналогичными системами животных. Хотя по некоторым данным, несмотря на принципиальные различия в специализации, между системами секреции патогенов животных и растений имеются черты сходства. Так, показано, что белки lipB, lipC и lipD, представляющие компоненты системы секреции липазы патогена человека *Serratia marcescens* и компоненты PrtD, PrtE и PrtF транспортера металлопротеазы фитопатогенной бактерии *Ewinia chrysanthemi* характеризуются высокой степенью гомологии (45–55%) [7].

Бактериальные системы секреции различаются как по степени сложности, так и по видам секретируемых белков (субстратов). Еще в начале 2000 гг. признавалось существование только пяти типов секреторных систем [8–10], а в настоящее время получили экспериментальное подтверждение системы секреции VI–IX типов [11, 12].

Три из девяти систем относятся к двухэтапным (или двухшаговым). Первый этап такой секреции включает перенос предназначенного для секреции белка из цитоплазмы бактериальной клетки в периплазматическое пространство. Для его осуществления у бактерий существует два механизма. Один из них назван двуаргининовым путем (**TAT**, от pathway **t**wo-**a**rginine **t**ranslocation), второй – Sec-путь (от **sec**retory – секреция) [13–15].

Оба эти пути перемещения белков через мембраны функционируют в клетках микроорганизмов всех уровней клеточной организации, поскольку соответствующие им белки обнаружены у архей, эубактерий и эукариот. Sec-путь предназначен для транспорта белков, не прошедших посттрансляционный фолдинг, в то время как TAT-путь обеспечивает проведение через мембрану только белков, полностью принявших конформацию, характерную для их активной формы [16]. У архей и грамположительных бактерий Sec- и

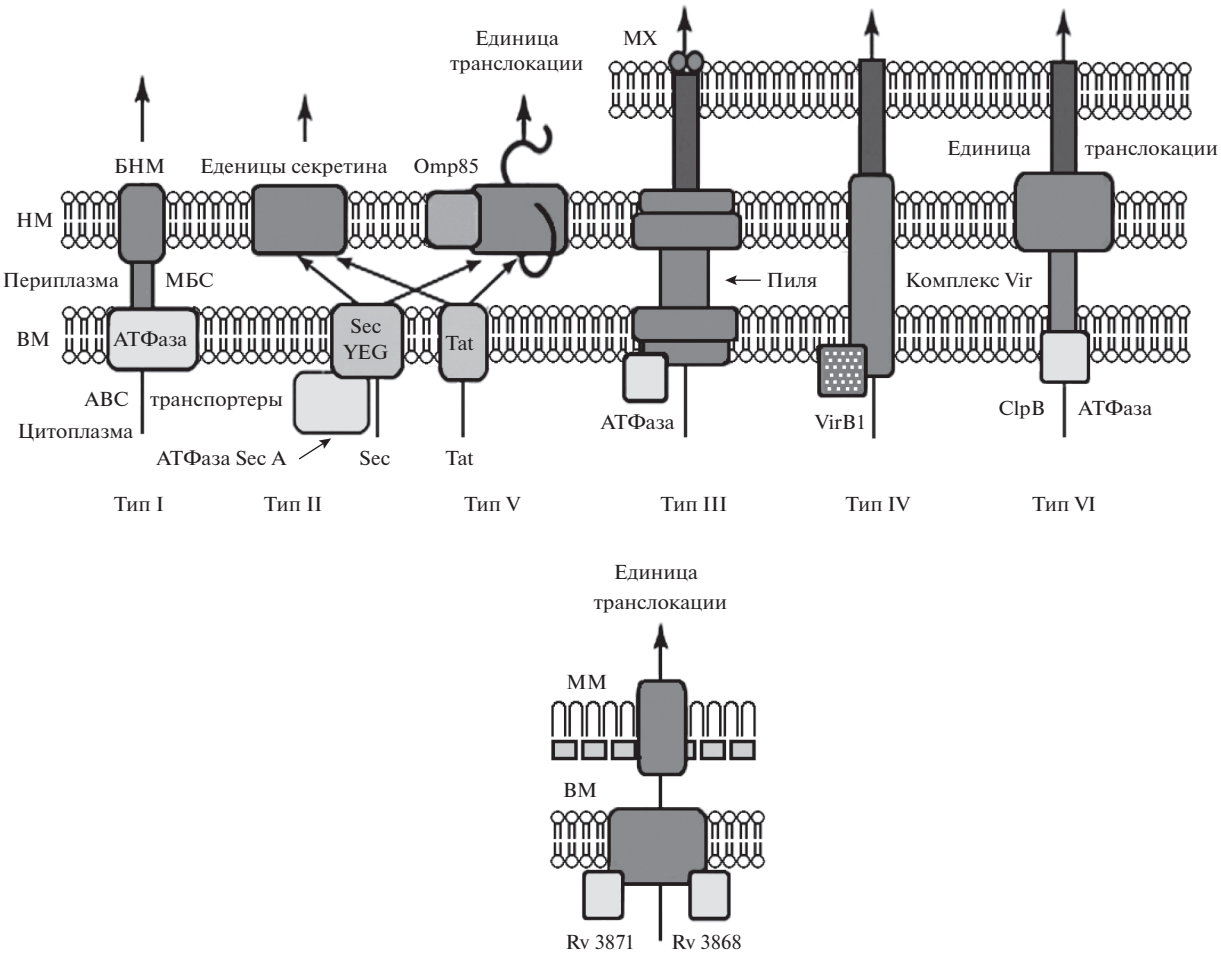


**Рис. 1.** Упрощенные схемы 7 систем секреции бактерий: МХ – мембрана клетки хозяина, НМ – наружная мембрана, ВМ – внутренняя мембрана, ММ – микромембрана, БНМ – белок наружной мембраны, МБС – мембранный белок слияния, АТФаза SecA – АТФаза SecA-секреторного пути, АТФаза ClpB – АТФаза T6SS, Rv3871 и Rv3868 – шапероны и Omp85 – белок внешней мембраны бактерий.

ТАТ-пути обеспечивают выведение некоторых белков непосредственно в окружающую среду. У грамотрицательных бактерий они функционируют как начальные этапы двухступенчатой системы секреции, к которым относятся системы 2 (**T2SS**), 5 (**T5SS**) и 9 (**T9SS**) типов [8–10].

Sec-путь обеспечивается цитоплазматическим белком SecA и интегрированными в цитоплазматическую мембрану белками SecY, SecE, SecG и SecDF [15, 17, 18]. Белки, предназначенные для транспорта таким путем, имеют в качестве N-концевой сигнальную последовательность, с которой еще во время трансляции связывается белок SecA. Далее SecA-белок самостоятельно или с помощью белка-шаперона SecB (этот шаперон используется некоторыми белками для предотвращения сворачивания готовой белковой цепи в нативную структуру) доставляет направляющийся на секрецию белок к тому месту внутренней мембраны, где находятся белки SecY, SecE и SecG. Он прикрепляет секретируемый белок к белку SecY и одновременно энергетически обеспечивает процесс транслокации, поскольку обладает АТФ-азной активностью. Транслоцируемый белок через образованную белками SecY, SecE и SecG пору перемещается в периплазматическое пространство, и специальная пептидаза отщепляет от него сигнальную последовательность, после чего освободившийся от связи с мембраной белок может принять нативную конформацию [19].

У грамположительных бактерий помимо основного Sec-пути была обнаружена его разновидность, так называемый ExPortal, который представляет собой уникальный одиночный микродомен клеточной мембраны [20]. На примере *Streptococcus pyogenes* было показано, что ExPortal функционирует как самостоятельная органелла, координирующая взаимодействия между возникающими вновь и не прошедшими фолдинг секретируемыми белками и связанными с мембраной шаперонами. В связи с этим белок HtrA (DegP), являющийся поверхностным заякоренным аксессорным факто-

ром, необходимым для созревания цистеиновой протеазы SpeB, локализуется исключительно в ExPortal. В *Lactococcus lactis* для обработки секретируемых пробелков и для созревания их нативных форм используется единственная внеклеточная протеаза HtrA, ответственная за деградацию аномальных белков [21]. Мутации, которые нарушали закрепление HtrA, но не ее протеазную активность, изменяли кинетику созревания цистеиновой проеазы SpeB, демонстрируя, что для ее функционирования важна локализация на ExPortal. Эти данные показывают, что ExPortal обеспечивает механизм, с помощью которого грамположительные бактерии могут координировать секрецию белков и их последующий биогенез в отсутствие специализированного компартмента для фолдинга белков [20].

**TAT-путь.** TAT-путь реализуется для белков, у которых в сигнальной последовательности, также расположенной в N-концевой части, имеется характерное сочетание аминокислотных остатков с двумя остатками аргинина: S/TRRXFLK (слева направо: остатки серина или треонина, два остатка аргинина, остаток любой аминокислоты, фенилаланина, лейцина и лизина). Как уже упоминалось, через TAT-систему проводятся белки в своей окончательной конформации, и чаще всего это белки, включающие небелковый компонент, например, содержащий металлы-кофакторы. Поэтому канал, который формирует TAT-система в мембране, имеет диаметр, позволяющий пройти белкам с поперечными размерами около 70 Å, тогда как пора в Sec-пути имеет диаметр, соответствующий толщине α-спирали белковой молекулы около 12 Å [22]. Для формирования широкого канала объединяются несколько десятков молекул белка TatA, которые первоначально встроены в мембрану как отдельные субъединицы. В тоже время при выведении в периплазму по Sec-пути белка, не принявшего окончательную конформацию, достаточно присутствия в мембране тримера из белков SecY, SecE и SecG [2]. О существенной роли TAT и Sec-систем в жизнедеятельности фитопатогенов свидетельствует тот факт, что мутации в этих системах экспорта белков у *P. syringae, Ralstonia solanacearum, Xanthomonas oryzae* и *Agrobacterium tumefaciens* приводили к потери их вирулентности [2].

**Система секреции первого типа (T1SS).** Сравнительный анализ показывает, что система секреции 1, так же, как система 3 типа (**T3SS**), секретирует белки через цитоплазматическую и внешнюю мембраны бактерий за одну стадию [2, 3]. Энергозависимые стадии процесса транспорта обеспечивают АТФазы, включающие специфические АТФ-связывающие белки-транслокаторы, названные ABC-транспортерами. Интересно, что ABC-белки являются консервативными и осуществляют трансмембранный перенос большого количества субстратов как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Они, как правило, состоят из двух закрепленных в мембране гидрофобных и двух консервативных гидрофильных АТФ-связывающих доменов, которые могут быть частями как одного, так и нескольких отдельных полипептидов. Большинство бактериальных ABC-транспортных систем включает в себя различные дополнительные белки. Один из них – **MFP** (membrane fusion protein), обеспечивает слияние цитоплазматической и наружной мембран, и фактически образует канал, через который транспортируется секретируемый белок, другой – **OMP** (outer membrane protein), так называемый белок-щвейцар (gatekeeper), локализованный во внешней мембране. Его функцией является создание секреторного мембранного канала и его закрытие в отсутствие субстрата [23, 24].

Эксперименты по секреции α-гемолизина на модельной *E. coli* показывают, что ABC-транспортер и MFP ассоциируются еще до связывания с субстратом, а прикрепление субстрата к этому комплексу индуцирует контакт MFP с OMP. Это соединение является обратимым и разрушается сразу после экспорта субстрата. Энергия гидролиза АТФ посредством ABC-транспортера расходуется только на транслокацию субстрата и не требуется для связывания субстрата или для сборки комплекса [25]. В рамках первой системы секреции функционирует несколько их разновидностей. Так показано, что у азотфиксирующего микросимбионта бобовых *R. leguminosarum* bv. *viciae,* функционируют четыре различных вида системы секреции I типа [6]. Один из них состоит из трех компонентов TolC, HlyD и HlyB. Белок TolC является аналогом OMP для экспорта α-гемолизина и представляет собой тримерный комплекс, расположенный во внешней мембране. Предполагается, что он имеет α-складчатый мембранный домен с гидрофильной C-концевой областью, расположенный в периплазматическом пространстве [25]. Периплазматический MFP, аналогом которого является HlyD, также представляет собой тример и взаимодействует как с OMP, так и с ABC-транспортером, роль которого выполняет HlyB. HlyD содержит короткий гидрофильный N-концевой домен, заякоренный во внутренней мембране, включающий около 150 аминокислотных остатков, крупный гидрофобный домен, расположенный в периплазме, включающий 275 аминокислотных остатков, и C-концевой домен, также содержащий 275 аминокислотных остатков [26]. Точная структура HlyB пока не установлена, но предполагается, что он состоит из восьми доменов. Два из них расположены в N-концевой области, и шесть – в центральной гидрофобной области. Также в *R. leguminosarum* bv. *viciae* штамм 3841 был обнаружен белок, необходимый для процесса нодуляции, **NodO**, который секретируется с помощью T1SS и кодируется геном *prsDE* [6]. Мутация в *tatC*, которая кодирует Sec-независимую

транслокаазу белка в *R. leguminosarum*, продуцирует только белые, не фиксирующие азот клубеньки при инокуляции *Pisum sativum* [6].

Изучение секреции гемопротеина патогена человека *Serratia marcescens* и металлопротеазы бактериального возбудителя мягкой гнили растений *Erwinia chrysanthemi* указывает на существование еще одной модели 1 системы секреции. Согласно этой системе ABC-транспортер и MFP не связываются перед закреплением субстрата. Субстрат в первую очередь связывается с ABC-транспортером, а затем образовавшийся комплекс ассоциируется с MFP, и только потом происходит связывание с OMP, после чего протекает секреция субстрата [25].

В то же время показано, что не все комбинации между компонентами гибридных секреторных систем являются активными. Так, HasE формирует активные экспортеры и с PrtF, и с TolC, тогда как PrtE может формировать активный экспортер только с PrtF, но не с TolC. Исследования этих мультибелковых комплексов *in vitro* подтвердили существование некоторых функциональных различий между HasE и PrtE. У симбиотического азотфиксатора растений *R. leguminosarum* в среду роста секретируются 14 субстратов, характерных для I типа. Они не имеют сигнальных N-концевых последовательностей. Вместо них имеются C-концевые секреторные сигналы, расположенные в пределах последних 60 аминокислотных остатков, впервые обнаруженных в молекуле α-гемолизина [27, 28]. Было установлено, что наименьшая C-концевая последовательность протеазы PrtG возбудителя мягкой гнили растений *E. chrysanthemi*, позволяющая начать эффективную секрецию, содержит ее последние 29 аминокислотных остатков. Однако низкая, но, все же существенная секреция может быть индуцирована и последними 15 аминокислотными остатками PrtG [29]. Было показано, что C-концевая сигнальная последовательность, состоящая из отрицательно заряженных аминокислотных остатков, является консервативной для гомологичных протеаз [30]. Сравнение последовательностей показало, что липазы тоже имеют сходные с протеазами C-концевые последовательности. Однако секреторные сигналы протеаз и различного рода токсинов различаются и являются специфическими, при этом комплементация между компонентами систем секреции этих двух семейств белков является очень незначительной. Тем не менее, наличие специфического транспортера определяет секрецию любого белка, даже чужеродного [31].

При изучении процессов секреции белков была показана важная роль особой области, расположенной на большинстве экспортируемых субстратов выше C-концевой сигнальной последовательности. Белки, содержащие такую последовательность, принадлежат к семейству RTX (Repeats-in-Toxins), классическими представителями которых являются цитолизин и гемолизин патогенов животных и человека [32]. Аденилатциклазы, токсины, протеазы и липазы, секретируемые системой секреции первого типа, имеют такую же область, состоящую из богатой глицином последовательности (GGXGXD), которая в зависимости от белка повторяется 4–36 раз. Возможно, что богатые глицином повторы действуют как внутренние шапероны, способствуя лучшему разделению секреторного сигнала и белка [31].

У ризобий с помощью T1SS секретируются белки PrsDE, участвующие в регуляции роста бактерий и переносе nod-факторов, в частности, NodO [33]. Этой системой секретируются глюканазы, включенные в процессинг бактериальных экзополисахаридов, и белки адгезии. Ферменты, гидролизующие клеточную стенку растений, целлюлазы и пектиназы, у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *viciae* попадают на поверхность растительных клеток через систему секреции 1 типа [34]. У *Sinorhizobium meliloti* этим путем происходит индукция продукции полигалактуроназы [35]. В патогенезе мягкой гнили *D. dadantii* большая роль принадлежит RTX-протеазам [2]. Две из них секретируются в виде зимогенов, которые активируются после секреции [32].

**Система секреции второго типа (T2SS).** Эта система секреции устроена уже более сложно и является Sec-зависимой, поэтому секреция с помощью этого аппарата осуществляется в два этапа. Поскольку с помощью T2SS секретируется большое число разнообразных субстратов, его часто называют “общим секреторным путем” (**GSP**, General Secretory Pathway).

На первом этапе белки экспортируются через цитоплазматическую мембрану, далее они либо остаются в периплазме, либо секретируются через внешнюю мембрану посредством терминальных компонентов системы секреции T2SS [36]. В соответствии с этим различают белковые комплексы, встроенные во внутреннюю (**IM**) и внешнюю (**OM**) мембраны. Однако еще никогда T2SS не была визуализирована в очищенной форме, поскольку ее организация носит динамический характер. В T2SS были выделены четыре мультибелковых комплекса (T2SS subassemblies), включающие псевдопили, комплекс внешний мембраны, платформу цитоплазматической мембраны и секреторную АТФазу, которая находится в цитоплазме и является Zn-зависимым мультисубъединичным ферментным комплексом [9, 36]. Псевдопили представляют собой волокнистые структуры в периплазматическом пространстве, они образованы пятью различными белками-псевдопилинами и включают множество копий основного псевдопилина. Комплекс внешней мембраны образован в основном мультимерным белком-секретином [36]. Платформа цитоплазматической мембраны является тем компонентом T2SS, который обеспечивает

структурную целостность транслокационного комплекса и состоит по меньшей мере из четырех мембранных белков. Она взаимодействует с комплексом внешней мембраны, псевдопилями и секреторной АТФазой.

Располагающийся в цитоплазматической мембране канал, состоит из АТФазы – SecA, сигнальной пептидазы и нескольких белков, включающих SecD, SecE, SecF, SecG и SecY. Цитоплазматический шаперон SecB транспортирует секретируемый белок к этому каналу. Сигнальная пептидаза отщепляет сигнальную последовательность в секретируемом белке, а SecA расщепляет АТФ, благодаря чему белок поступает в периплазматическое пространство, в котором под действием некоторых шаперонов претерпевает конформационные перестройки, необходимые для транспорта через наружную мембрану. Наряду с классическими шаперонами фолдингу способствуют также белки DsbA и DsbC, являющиеся дисульфидизомеразами [37]. Функция этих белков заключается в образовании дисульфидных мостиков между остатками цистеина в молекулах белков, которые стабилизируют третичную структуру и необходимы для его функционирования. Дисульфидные мостики образуются в периплазме с участием ферментов DsbA и DsbC. Если зрелый белок должен содержать дисульфидные связи, то без их образования под действием DsbAC секреция за пределы периплазмы, как правило, невозможна. Например, у фитопатогена *E. chrysanthemi* фермент DsbA необходим для получения почти всех секретируемых факторов вирулентности, стабильности и секреции целлюлаз и нескольких пектиназ, а также для регуляции процесса секреции на различных уровнях метаболизма от транскрипции до секреции белка [37]. Например, у мутанта dsbA экспрессия 25 генов, участвующих в моторике и хемотаксисе, была значительно уменьшена, а флагеллярные белки отсутствовали вовсе.

Как отмечалось ранее, секрецию с помощью второй системы часто называют общим секреторным путем, который имеет несколько разновидностей, называемых “терминальными ветвями общего секреторного пути”. Такой способ секреции хорошо исследован у патогенов животных, а у растительных патогенов, например у эрвиний, показано, что все гены, кодирующие компоненты терминальной ветви, собраны в один кластер размером 13–15 т. п. н., в котором локализовано 12–15 генов, имеющих общее название *out* или *gsp* [38].

В настоящее время нет устоявшегося мнения о том, как работает аппарат GSP. Вероятнее всего, многочисленные его компоненты взаимодействуют друг с другом, образуя трансмембранную структуру, простирающуюся от внутренней стороны цитоплазматической мембраны через периплазму вплоть до внешней мембраны [3].

Известно, что первым барьером при встрече патогена с растением является растительная клеточная стенка, состоящая из матрицы полисахаридов, белков и фенольных соединений. При инфицировании возбудителями мягких гнилей растений, к которым относятся различные виды *Erwinia*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas и Ralstonia*, система T2SS используется для секреции большого количества широкого спектра гидролаз. Например, *D. dadantii* выделяет по меньшей мере девять различных пектатлиаз, расщепляющих полигалактуронат [39]. Эта избыточность в секретируемых ферментах, вероятно, обеспечивает эффективность механизмов патогенности. Помимо ферментов, разрушающих клеточные стенки растений, через T2SS секретируются и другие белковые факторы вирулентности фитопатогенов. Так, *E. carotovora subsp. atroseptica* [40] секретирует белок Svx, гомологичный белку AvrXca у *X. campestris,* без которого невозможно развитие гнили картофеля. Следует отметить, что система секреции 2 типа высоко специфична. Несмотря на то, что белки–компоненты секреторного аппарата очень сходны друг с другом, их субстраты не будут секретироваться даже близкородственными бактериями. Так, например, пектатлиазы фитопатогена *E. carotovora* не будут секретироваться из близкородственного вида *E. chrysanthemi,* несмотря на то, что сходство белков секреторного аппарата превышает 90%. Это свидетельствует о том, что аппарат секреции содержит какой-то видоспецифический компонент. Предполагают, что у *D. dadantii* и *P. carotovorum* на эту роль могут претендовать специфические “привратники” белки GSP, OutCGspC и OutDGspD [37].

**Система секреции 3 типа (SS3T).** Одним из главных инструментов патогенных грамотрицательных бактерий являются белки-эффекторы, секретируемые при помощи транспортной системы третьего типа в клетки растения-хозяина. Например, у *P. syringae,* подвиды которого паразитируют на широком круге видов растений, было выявлено более 30 эффекторных молекул [41].

Изучение T3SS начиналось с патогена человека *Yersinia enterocolitica*. Девять генов, кодирующих белки этой системы (обозначенные как **Ysc**), высоко консервативны и их гомологи обнаружены у всех бактерий, для которых описана система третьего типа [42, 43]. Восемь из них имеют также гомологию с генами, участвующими в процессах образования жгутиков [44]. Считают, что кодируемые этими генами белки нужны для формирования специфического и находящегося внутри жгутика канала через внутреннюю мембрану, который обеспечивает экспорт компонентов, необходимых для построения собственно жгутика. Один из этих белков содержит типичную АТФ-связывающую последовательность и, очевидно, вовлечен в передачу энергии, необходимой как для сборки “секреторной машины”, так и для собственно процесса

секреции. Белок YscC, не имеющий гомологии с белками биогенеза жгутиков, представляет собой типичный секретин [45]. Секреция белков–эффекторов происходит через шприцеподобную структуру, состоящую из 20 различных по структуре белков. При контакте с клеткой-мишенью белки полимеризуются и образуют канал, пронизывающий внутреннюю и наружную мембраны, а на поверхности формируют длинную пилеподобную структуру. Шприцеподобный канал в области наружной мембраны стабилизируется кольцеподобной структурой с большой центральной порой [45]. Отличительной чертой T3SS является доставка секретируемых белков прямо в клетку-мишень, которую называют также инжектосомой (injectosome), а 3TSS относят к контактной секреции [46].

Когда инжектосома сформирована, секретируемый белок с сигнальным пептидом (20 аминокислотных остатков) в N-концевом участке связывается с цитоплазматическим шапероном, транспортируется по каналу SS3T и впрыскивается в клетку-мишень. Проникновение в клетку хозяина через SS3T сопряжено с полным или частичным разворачиванием белковой молекулы, что предполагает ее взаимодействие с шаперонами хозяина для восстановления структурной конформации и активации глобулы [46]. У растений в качестве таких шаперонов могут выступать пептидилпролил цис/транс изомеразы [47].

У бактерий, взаимодействующих с растениями, белки–эффекторы T3SS изучены в различной степени как у фитопатогенных представителей *Pseudomonas, Xanthomonas, Ralstonia и Erwinia* [41, 48–50], так и у симбиотических бактерий, в частности у различных видов *R. leguminosarum* [51, 52]. Патогенные и фитопатогенные бактерии различаются по количеству и организации генов T3SS, что и было взято за основу при ее систематизации. Всего было сформировано семь типов, три из которых представлены в мутуалистических и фитопатогенных бактериях: а – *Rhizo* у видов *Rhizobia,* б – *Hrp1* (*P. syringae* и *E. amylovora*) и в – *Hrp2* (*Xanthomonas* spp.*, R. solanacearum* и *Burkholderia* spp.) [53].

Несмотря на то, что каждый вид фитопатогена имеет специфический набор эффекторов, которые принципиально можно разделить на две большие группы: Avr- и Dsp-белки (avirulence и disease specific proteins). Avr-белки узнаются соответствующими белками резистентных растений (R-белки, resistans), что приводит к индукции реакции сверхчувствительности (**СВЧ**) [54, 55]. Той же системой секретируются хелперы–белки, как правило, не попадающие в цитоплазму растительной клетки, но способствующие транслокации эффекторов. К числу последних относятся богатые глицином харпины, которые не содержат остатки цистеина и являются термостабильными гидрофобными белками, транспортирующимися в межклеточное пространство организма хозяина и, вероятнее всего, изменяющими проницаемость мембраны растительной клетки для облегчения транслокации эффекторов [56].

У *E. carotovora* ssp. *atroseptica* с помощью SS3T секретируются харпины HrpN, HrpW и эффекторный белок DspE. При этом харпин HrpW и белок DspE *Eca* секретируются за пределы клетки и легко обнаруживаются в культуральной среде [57], тогда как харпин HrpJ, хотя и секретируется за пределы клетки, но остается ассоциированным с ее поверхностными структурами и в культуральной среде не обнаруживается. Сочетание хелперного белка HrpN и эффектора DspE играет важную роль в блокировании защитного системного ответа. При этом белок DspE является основным действующим фактором, а хелперный белок HrpN участвует в транслокации DspE в клетки растений [58].

На основании того, что в клетках яблони белок DspE из *E. amylovora* способен связываться с несколькими мембранными рецепторными киназами, было сделано предположение о том, что аналогичное взаимодействие в клетках картофеля может нарушить сигнальный каскад, приводящий к синтезу медиаторов системного ответа, что в свою очередь способствует успешной пролиферации патогена в организме растения [48].

Для доказательства транслокации отдельных эффекторов в клетки растений была создана остроумная конструкция, содержащая аденилатциклазный домен (**Cya**) циклолизина *Bordetella pertussis.* Он выполнял роль биохимического репортера транслокации бактериальных белков в клетки эукариот и успешно применялся для доказательства транслокации Avr-белков в растения из клеток *X. campestris* [59] и *P. syringae* [60]. Так, AvrPto – ингибитор протеинкиназы, и AvrPtoB – убиквитин лигаза E3, подавляют рецепторные киназы **MAMP** (microbe-associated molecular patterns) индуцированного иммунитета растений, ингибируя активность или разрушая через их убиквитинирование такие рецепторные киназы, как рецепторная киназа FLS2 флагеллина, корецепторная киназа BAK1 и рецепторная киназа хитина CERK1 [61]. Установлено, что фосфотреонин лиаза HopAI1 инактивирует MAMP киназу, тирозин фосфатаза HopPtoD2 подавляет реакцию СВЧ, цистеиновая протеаза AvrRpt2 разрушает RIN4, заякоренный в плазматической мембране арабидопсиса белок, действующий как ключевой регулятор иммунитета растений, а ацетилтрансфераза HopZ1a разрушает сеть растительных микротрубочек и везикул [62]. У *X. campestris* pv. *vesicatoria* обнаружено 19 генов белков–эффекторов T3SS [47], среди которых хорошо известен эффекторный белок AvrBsT, член семейства белков YopJ/AvrRxv, найденного как у патогенов животных, так и у фитопатогенов. Этот белок, попадая в цитоплазму растения-хозяина, взаимодействует с широким спектром белков, включающих альдегиддегидрогена-

зу 1 перца (**CaALDH1**), heatshock белок перца 70a (**CaHSP70a**), супрессор G2 аллели ofskp1перца (**CaSGT1**), киназу перца SNF1(**SnRK1**) и ацетилированный белок из арабидопсиса (**ACIP1**). Механизм такого взаимодействия показан на примере белка CaSGT1, который связывает одновременно AvrBsT и рецепторную киназу (**CaPIK1**), локализованную в цитоплазме клеток перца. В результате происходит фосфорилирование AvrBsT и формирование активного комплекса AvrBsT–CaSGT1–CaPIK1. У устойчивых сортов растений это приводит к развитию реакции СВЧ и других защитных ответов [63, 64]. У *X. campestris* pv. *vesicatoria* также выявлены гены трех белков Xops (Xanthomonas outer proteins), которые участвуют в адгезии патогена на поверхности клеток растений и индуцируют реакцию СВЧ. Гомологи таких генов найдены и у других фитопатогенов [65]. Следует отметить, что нехозяйские виды растений реагируют на многие эффекторы *P. syringae* чаще и более интенсивно, чем хозяйские виды, и гомологичные/не гомологичные по последовательностям эффекторы вызывают некрозы в одних и тех же видах растений [50]. На основании этих данных было сделано предположение о том, что такие эффекторы могут взаимодействовать с одинаковыми молекулярными мишенями или сигнальными путями растений [66]. Так, среди изученных эффекторов HopAM1-1 из мутанта *P. syringae Pto*DC3000 вызывал некроз во всех генотипах испытанных томатов, включая чувствительный сорт для *Pto*DC3000 [66].

Довольно долго считалось, что система SS3T присуща только грамотрицательным бактериям, в то время как аналогичный механизм транслокации факторов вирулентности грамположительных бактерий не был известен. Лишь недавно на модели “культура кератиноцитов–стрептококк” была предложена схема транслокации факторов вирулентности в эукариотические клетки. По механизму действия она была названа “цитолизин опосредованной транслокацией” [67]. Показано, что в цитоплазматической мембране стрептококков помимо общего секреторного пути (Sec) с помощью стрептолизина О формируются поры диаметром до 30 нм, через которые осуществляется транспорт эффекторных молекул непосредственно в эукариотическую клетку. Эта конструкция вводит, по меньшей мере, один фактор вирулентности, НАД-гликогидролазу (**SPN**), в цитоплазму кератиноцитов [68]. Чтобы создать поры, необходимые для транслокации SPN, другой белок, SLO, сначала секретируется по пути Sec. SLO является членом класса токсинов, называемых холестерин-зависимыми цитолизинами (**CDC**), которые связывают холестерин на поверхности эукариотических клеток и внедряются в их мембраны, создавая поры. После образования пор с помощью SLO белок SPN транслоцируется через плазматическую мембрану в эукариотическую клетку также с помощью Sec. Как только он достигает цитозоля клетки хозяина, то расщепляет гликозидную связь β-NAD+ с образованием никотинамида и АДФ-рибозы, мощного вторичного мессенджера, тем самым нарушая нормальные клеточные функции. По этой причине SPN служит основным фактором вирулентности для *S. pyogenes*. Для патогенов животных этот феномен имеет большое значение, поскольку может быть использован в качестве мишени для действия новых противоинфекционных препаратов. Для фитопатогенов такие исследования пока малочисленны, однако существуют данные о том, что культуральная жидкость вирулентного штамма *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus,* возбудителя кольцевой гнили картофеля, инфильтрованная в листья табака, вызывала реакцию СВЧ. На основании этого было высказано предположение, что данный грамположительный фитопатоген секретирует специфические термостабильные белки, близкие по функциям к харпинам [69, 70].

Несмотря на то, что инфицирование симбиотическими азотфиксаторами направлено на установление взаимовыгодных отношений с растениями, на ранних этапах эти бактерии подавляют также фитоиммунитет [71]. В этом процессе SS3T микросимбионтов, в частности *Rhizobium* [52, 72] и *Bradyrhizobium* [73], играют существенную роль. Известно, что удаление T3SS предотвращает транспорт эффекторных белков в растение и блокирует развитие симбиоза. Гены, кодирующие T3SSs у *Rhizobium*, называются *rhc* и подразделяются на 4 семейства *Rhc-1- Rhc-4* [74]. Однако в симбиозе участвует только *Rhc-1* [75], а функции белков других семейств пока не установлены. Экспрессия T3SS индуцируется узнаванием растительных флавоноидов путем активации фактора транскрипции TtsI *Rhizobium* [76]. TtsI инициирует транскрипцию генов T3SS и эффекторных белков путем связывания со специфичными *cis*-элементами, известными как *tts* - боксы [77]. Количество и локализация таких боксов варьирует у разных видов. Например, у *B. japonicum* известно 52 различных *tts*-боксов. Белки, секретируемые через систему T3SS у симбиотических азотфиксаторов, подразделяют на две категории, образующие пили и эффекторы. К белкам, участвующим в формировании пилей, относят NopA, NopB и NopX, которые проникают через клеточную стенку и плазматическую мембрану растения [51, 71]. Следует отметить, что эффекторы T3SS *Rhizobium* могут влиять как позитивно, усиливая нодуляцию, так и негативно, ингибируя этот процесс. У *Bradyrhizobium* sp. методами *in silico* было выявлено 14 эффекторов T3SS и показано, что у четырех видов растений (*Arachis hypogea, Vigna radiata, Crotalaria juncea* и *Macroptilium atropurpureum)* эти эффекторы позитивно влияли на нодуляцию, способствуя увеличению количества клубеньков, а у одного вида (*Stylosanthes hamata)* воздействовали

негативно, уменьшая количество клубеньков и уровень азотфиксации, однако на четыре вида (*Aeschynomene afraspera, Indigofera tinctoria, Desmodium tortuosum* и *A. americana)* эти эффекторы не оказывали воздействия [73]. Аналогичный эффект был показан при инокуляции *Sinorhizobium fredii* вигны *(Vigna unguiculata)*. Таким образом, последствия от действия эффекторов T3SS во многом зависят от того, какой вид бобового растения участвует в симбиозе [78, 79].

Роль эффекторных белков ризобий во многом схожа с их ролью у фитопатогенов. Так, на примере "не азотфиксирующего" растения *Nicotiana tabacum* показано, что эффекторный белок NopL может фосфорилироваться растительными киназами [80] и влиять на передачу сигналов от митоген-активируемой протеинкиназы (**MAPK**). При этом NopL способен подавлять развитие клеточной смерти, индуцированной сверхэкспрессией MAP-сигналинга [81]. Известно, что MAP-киназы участвуют в узнавании патогенов на ранних стадиях патогенеза и связаны с активацией R-генов [82]. Эффекторный белок NopT обладает активностью цистеиновой протеазы. Предполагается, что он может индуцировать целевой автопротеолиз клеточных мембран [83]. Некоторые эффекторные белки данной системы осуществляют специфическую регуляцию симбиотической азотфиксации. Так, Nop M обладает E3 убиквитинлигазной активностью, которая необходима при формировании клубеньков, потому что потеря этой активности приводила к неспособности растений формировать их [84]. У *B. elkanii* эффекторные белки SS3T взаимодействуют с генами сои *ENOD40* и *NIN,* отвечающими за узнавание Nod-факторов (липополисахаридов ризобий). При этом мутант *Bradyrhizobium,* дефицитный по SS3T, не был способен индуцировать развитие клубеньков. Таким образом, как у фитопатогенов, так и у мутуалистов большинство эффекторов SS3T направлено на подавление MAMP и ETI (эффектор-запускаемого) типов иммунитета растений [85, 86].

**Система секреции 4 типа (SS4T).** Система SS4T на основании первичных функций может быть разделена на три подтипа: а – ДНК коньюгация, б – ДНК поглощение/освобождение и в – транслокация белков. T4SS имеет выраженное сходство с аппаратом конъюгации ряда плазмид и, вероятно, произошла от него [2]. По некоторым данным отдельные компоненты этой системы, например, пили и флагеллы, играют существенную роль в подвижности, адгезии бактерий к твердым поверхностям и формировании биопленок [87, 88]. Эта экспортная система характеризуется чрезвычайно широкой специфичностью как по отношению к субстратам (крупные нуклеопротеидные комплексы, мультикомпонентные белковые токсины и мономерные белки), так и по отношению к мишеням секреции, в качестве которых могут служить бактерии, грибы, растения и животные, иными словами – клетки представителей всех царств за исключением архей.

Известными примерами бактериальных патогенов животных, использующих T4SS для проявления вирулентности, являются *Neisseria gonorrhoeae L. pneumophila, Brucella suis* и *Helicobacter pylori,* которые используют их для транслокации эффекторных белков в клетки-хозяева во время инфекции [87, 89]. В настоящее время *A. tumefaciens* является единственным известным фитопатогеном, обладающим T4SS для транслокации T-DNA нуклеопротеинового комплекса в клетки растений [2].

VirB/DT4SS, функционируюшая у *A. tumefaciens,* содержит 12 белков, обозначенных как VirB1-VirB12 и VirD4 [90]. Самые большие из них являются мембранно-связанными и представлены несколькими копиями. Белки VirB6-10 найдены в периплазме, внутренней и внешней мембранах, и формируют секреторный канал так же, как их акссесорные белки. VirB4, VirB11 и VirD4 локализованы во внутренней мембране и функционируют как АТФазы, обеспечивая систему энергией. Белок VirD4 необходим для связывания других белков перед секрецией через канал. Считается, что субстратная ДНК или белок сначала вступают в контакт с VirD4, функционирующий как молекулярный "затвор" у основания аппарата секреции [91]. Затем VirD4 переносит субстрат к VirB11, который доставляет его к комплексу внутренних мембранных каналов. Наконец, субстрат переносится через периплазму к белковому комплексу наружной мембраны. T4SSs содержит внеклеточные пили, состоящие из самой большой (VirB2) и самой маленькой (VirB5) субъединиц. Точно неизвестно, какую роль пили T4SS играют в процессе секреции. Существует мнение, что, с одной стороны пиль может служить лишь прикрепительным устройством, позволяющим бактериям плотно контактировать с клетками-мишенями [90], а с другой – пиль может выполнять роль канала для транслокации субстрата, особенно в клетки-мишени [92].

Таким образом, конъюгационные системы можно рассматривать как аппарат секреции белка, приспособленный для экспорта ковалентно связанной с белком ДНК. Показано, что конъюгационные системы могут транспортировать и белки, не связанные с ДНК. Так, Tra аппарат плазмиды RP4 секретирует белок RecA [93], а система переноса T-ДНК способна секретировать VirE2 (SSB белок) и еще один фактор вирулентности, VirF, у патогена человека *Yersinia pestis* [94].

В отличие от T3SS информация о роли T4SS в симбиозе весьма малочисленна. В ризобиях T4SS характеризуются высокой степенью гомологии с субъединицами VirB/VirD4, обнаруженными в *Agrobacterium*. Транскрипция T4SS контролируется двухкомпонентным регулятором VirA/VirG

[52]. Белок VirA является мембранно-связанной киназой, фосфорилирующей VirG в ответ на внешние факторы [95]. А белок VirG, который связывается с боксами *vir,* активирует транскрипцию. У *Rhizobium* эти регуляторы индуцируются флавоноидами, активирующими VirG [96]. Продолжая аналогию с *A. tumefaciens,* можно отметить, что у обоих видов бактерий найден в С-концевой части одинаковый необходимый для транслокации мотив, заряженный положительно и присутствующий в эффекторных белках [97]. Для транспорта через канал белок VirD4 взаимодействует с этой положительно заряженной сигнальной последовательностью, что обеспечивает бо̀льшую специфичность в транспорте белков [97]. В частности у *Mesorhizobium loti* она идентифицирована в эффекторных белках Msi059 и Msi061, которые являются у микросимбионтов белками-субстратами SS4T, единственными известными в настоящее время [96]. Msi059 обладает частичным сходством с цистеиновой пептидазой C48. Семейство этих пептидаз содержит белок XopD растительного патогена *X. campestris* [98]. Ее мишенями в растениях являются конъюгированные белки SUMO [98], разрушение которых мешает им регулировать экспрессию специфических защитных белков. Msi061 имеет также сходство с эффектором VirF*A. A. tumefaciens*, который взаимодействует с Skp1 (ключевой компонент убиквитинлигазы E3, осуществляющей деградацию белка) растения-хозяина для облегчения деградации эффекторных белков VirE2 и Vip1, участвующих в последующем освобождении Т-ДНК в клетки хозяина [99, 100]. Следует отметить, что у патогенов животных специфические сигнальные последовательности более разнообразны и более сложно устроены.

**Система секреции V типа(SS5T).** Она называется также системой автотранспортеров и первоначально была описана у *N. gonorrhoeae* при изучении продукции IgA1-протеазы [101]. Однако несколько позже было показано, что SS5T участвует в секреции целого ряда имеющих отношение к патогенности и вирулентности белков, в частности адгезинов [102]. В этой системе С-концевая последовательность секретируемого белка определяет экспорт N-терминального домена через наружную мембрану, что и послужило основанием для названия этой системы [103]. Большинство автотранспортеров несет N-концевую сигнальную последовательность, разрешающую выход в периплазматическое пространство с использованием Sec-пути. N-концевая сигнальная последовательность примыкает к домену α, за которым следует С-концевой домен β [104]. Последний предназначен для формирования пронизывающей мембрану бочкообразной (barrel) структуры, стенки которой состоят из 10–14 петель полипептидной цепи α-домена. Через такой "бочонок" перемещается домен α, называемый также "пассажирский домен". После выхода на наружную поверхность клетки судьба "пассажиров" оказывается различной в зависимости от того, что секретируется. Два домена могут оставаться ковалентно или нековалентно связанными, или же α-домен может протеолитически отщепляться и функционировать самостоятельно уже во внеклеточном пространстве. Отщепление может происходить как автокаталитически, поскольку α- домены являются протеазами, так и с участием протеаз, локализуемых во внешней мембране. В том случае, когда пассажирский домен остается ковалентно связанным с α-доменом, он в большинстве случаев играет роль адгезина, т.е. фактора патогенности, обеспечивающего прикрепление к тканям организма-хозяина [103, 105, 106]. Такие белки–автотранспортеры присутствуют у широкого круга патогенов животных: AIDA-I – у *E. coli*, Ag43 и YadA – у *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* соответственно, адгезин Hia – у *H. influenzae* и Prn – у *Bordetella pertussis.* Помимо уже упоминавшейся IgA1-протеазы *N. gonorrheae* и *N. meningitidis*, показано участие в патогенезе ряда сериновых протеаз энтеробактерий. Они даже получили собственное название – SPATE (the serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae) [107]. К ним относятся токсин у SepA *S. flexneri*, PrtS у клинических штаммов *S. marcescens* и протеазы-муциназы Pic и SepA у различных видов шигелл. Из не относящихся к энтеробактериям патогенов, способных секретировать протеазы по пятому пути секреции, можно назвать *Haemophilus influenzae* (Hap-белок) [108] и *Bordetella pertussis* (протеаза SphB1) [109]. Белками–аутотранспортерами также являются эстераза EstA *P. aeruginosa* [110] и токсин VacA *Helicobacter pylori* [111]. Следует отметить, что все эти белки обладают достаточно большими молекулярными массами, превышающие массы белков, секретируемых через системы I и II типов. В последние годы по мере продвижения исследований получены новые уточняющие данные о компонентах этой системы и, в соответствии с этим, выделены следующие ее подвиды.

**Va секреторная система.** Секретируемые белки обладают всеми необходимыми признаками автотранспортеров, описанных выше, а автотранспортная субъединица в С-концевой области выполняет роль хелпера, необходимого для секреции через наружную мембрану. Таким образом, белок–эффектор начинает секретироваться в виде предшественника, и в процессе транспорта созревает. Например, предшественник протеазы IgA1 гонококков имеет молекулярную массу 169 кДа, а зрелая протеаза – 106 кДа [112]. Примерами секретируемых таким путем факторов патогенности являются цитолизин ShlA *S. marcescens* (соответствующий ему TpsB назван ShlB), цитолизин EthA *E. tarda* (TpsB – EthB), адгезины HMW1 и HMW2 *H. influenza*e (TpsB – HMW1B и

HMW2B соответственно), адгезины LspA1 и LspA2 *H. Ducreyi* (TpsB – LspB1 и LspB2 соотвественно) и филаментный гемагглютинин FHA *B. pertussis* (TpsB – FhaC) [106]. Все эти белки обладают большими молекулярными массами и состоят из не менее чем 3000 аминокислотных остатков. Наибольший из секретируемых таким путем белков PAO1 был обнаружен при протеомном анализе *P. aeruginosa*, его молекулярная масса составляла 361594 Да, а количество аминокислотных остатков – 5627 [113].

**Тип Vb системы.** На первый взгляд тип Vb-системы подобен Va-системе, поскольку она содержит пассажирский домен и транслокационный домен, которые представлены двумя отдельными белковыми цепями, но экспрессируются из одного оперона. Этот тип называется также двупартнерской системой (Tps) [106]. Транслоцируемый белок обозначен как TpsB белок, а транспортируемые белки (соответствующие пассажирскому домену типа Va–автотранспортеров) – как TpsA белки. Следует отметить, что белок TpsB, образующий транслокационную пору, содержит дополнительные периплазматические домены, не представленные в классических автотранспортерах.

**Тип Vc система.** Эта система является наиболее сложной и представляет собой тример, который функционирует в основном как бактериальные адгезины. Это позволило дать им альтернативное название тримерные автотранспортные адгезины (**TAA**) [114]. Пассажирские домены Vc весьма разнообразны, тогда как их транслокационный домен высоко консервативен. Vc-система является единственной из разновидностей систем V-типа, у которой транслокационная пора представлена олигомером.

**Тип Vd системы.** Этот тип был описан недавно и в деталях изучен только на нескольких примерах [115]. Существует мнение, что они относятся к пататин-подобным белкам из *P. aeruginosa*, обозначенные как PlpD. Их "пассажирский" домен обладает липолитической активностью и разрушается автокаталитически после завершения автотранспорта [115]. Основная структура таких белков сходна со структурой белков Va-системы, содержащих C-концевой транслокационный домен и N-концевой "пассажирский" домен. Однако в отличие от классических автотранспортеров эти домены взаимодействуют через дополнительный периплазматический домен, гомологичный Vb транслокационной поре.

**Тип Ve системы.** Другое название системы обратный автотранспортер, поскольку он имеет обратный порядок доменов, его C-концевая часть включает в себя "пассажирский" домен, а N-концевая часть образует транслокационную пору [115]. Белок интимин из *E. coli* и инвазин из *Yersinia* spp. являются адгезинами с внеклеточным Ig доменом, закрепленным в бактериальной внешней мембране [116]. Интимин осуществляет тесную связь патогенной кишечной палочки с клетками хозяина, что приводит к формированию основания. Для этого второй белок (Tir) секретируется в клетку-хозяина и встраивается в ее плазматическую мембрану изнутри. Секреция и инъекция Tir опосредуется системой секреции 3 типа. Затем Tir действует как специфический рецептор для связывающего домена интимина в клеточной мембране хозяина [117]. Инвазин напрямую связывается с b1-интегринами, которые расположены на поверхности клетки хозяина. На *Yersinia* spp показано, что "пассажирский" домен является типичной Ig-протеазой и лектино-подобным доменом, который не обнаружен в других подвидах V типа секреции, но который широко распространен в адгезинах из грамположительных бактерий [118]. В N-концевой части полипептидной цепи присутствует маленький периплазматический домен, но он не гомологичен периплазматическому домену из Vb- и Vd-систем и в некоторых случаях содержит пептидогликан-связывающий мотив [118].

В настоящее время не установлено участие T5SS в вирулентности фитопатогенов и микросимбионтов, хотя имеется несколько примеров, описывающих предполагаемые адгезины. У *D. dadantii* белок, состоящий из более 3800 аминокислотных остатков и гомологичный T5bSS, необходим для бактериальной адгезии к поверхности листьев, агрегации бактерий и стимуляции гибели клеток хозяина [2]. Этот адгезин также содержит каталитический остаток в C-концевой части полипептидной цепи и гомологичен цитотоксической рибонуклеазе, которая является целевой для 16S рибосомальной РНК бактерий. Это предполагает его потенциальную роль в контактно-зависимом торможении роста [119]. Белки-кандидаты T5bSS, состоящие из более чем 3000 аминокислотных остатков, были обнаружены в *Xanthomonas axonopodis* и *Xylella fastidiosa*. Такие субстраты также участвуют в адгезии [120, 121]. Предполагается, что XatA T5aSS *X. fastidiosa* представляет собой большой поверхностный белок [122]. Его роль в адгезии подтверждается тем, что дефицитный мутант xatA не обеспечивал успешную агрегацию бактерий этого вида. Данные *in silico* также обнаружили белки, связанные с T5SS у *E. chrysanthemi* и *D. dadantii*. На основе C-концевых последовательностей, гомологичных белкам, токсичным для бактерий, эти предполагаемые T5SSs субстраты были отнесены к белкам, подавляющим конкурирующие бактерии, но не участвующие в вирулентности [123].

**Система секреции 6 типа (T6SS).** Эта система была описана относительно недавно. В начале 2000 годов при анализе сиквенсов островков патогенности бактериальных возбудителей болезней животных и растений было зафиксировано консервативное семейство генов, функции которых на тот момент были не ясны [124]. Но к 2006 г. удалось установить, что продукты этих генов формируют

специализированную секреторную систему, функционально сходную с системами III и IV типов, которая обеспечивает доставку секретируемого белка непосредственно в цитоплазму хозяйских клеток [125, 126].

В основном эта система представлена в клетках представителей *Proteobacteria*, в частности *Vibrio cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *P. aeruginosa*, *Francisella tularensis* и *Burkholderia mallei*, сходные группы генов обнаружены у фитопатогенов, микросимбионтов и почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, *Dickeya dadanti*, *R. leguminosarum*, *Pectobacterium atroseptium*, *Ralstonia solanacearum*, *P. syringae*, *P. fluorescens* и *P. protegens* [127]. Предполагают, что у непатогенных бактерий T6SS может участвовать в образовании биопленок, а патогены могли получить гены, кодирующие эту систему, в результате горизонтального переноса [128]. Количество генов, входящих в T6SS-кластеры, колеблется от 15 до 25, и пока еще не все продукты этих генов охарактеризованы структурно и функционально. В структурную часть этой системы входят белки Hcp (hemolysin coregulated protein) [129] и VgrG (valine–glycine repeat protein G) [130], описанные для патогенного штамма *E. coli*. Гомологи этих белков или кодирующие их гены у других видов бактерий могут иметь другие обозначения, но их наличие считается критерием присутствия у данных бактерий системы T6SS [131].

Было установлено, что выделенный и очищенный белок Hcp способен образовывать кольцевые олигомеры из шести молекул, которые затем объединяются в трубочки с внутренним диаметром 40 Å и длиной около 100 нм [125]. Белок VgrG имеет ярко выраженное структурное сходство с белками бактериофага T4, которые формируют так называемую “иглу” (the needle complex) на конце хвостового отростка. С помощью этого комплекса бактериофаг прокалывает мембрану и вводит свою ДНК в цитоплазму бактериальной клетки. В белках Gp27 и Gp5, образующих “иглу” бактериофага, в C-концевом домене имеются характерные α-спиральные участки, от которых зависит способность белков проходить через мембрану. Именно такие участки обнаружены в белке VgrG и его аналогах у других бактерий. Как бактериофаг, так и белок VgrG образуют комплекс из трех молекул (тример), который собирается в “иглу” [125]. Последовательность T6SS была определена у пяти разных видов ризобий *R. leguminosarum, B. japonicum, M. loti, S. saheli* и *S. fredii* [132, 133], однако ее функциональная роль еще не установлена.

**Система секреции 7 типа (T7SS).** Существование 7 системы секреции было предсказано в конце 1990 гг. при анализе полной последовательности генома типового штамма возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* H37 *Rv* и далее подтверждено в ходе экспериментальной работы с другими штаммами *M. tuberculosis* и другими видами рода *Mycobacterium* – *M. bovis, M. avium* и *M. marinum* [134]. В настоящее время функционирование данной системы показно у многих грамположительных патогенов млекопитающих: *Corynebacterium diphtheria*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* и *Streptomyces coelicolor*. Это предполагает, что система секреции типа 7 должна рассматриваться как общая секреторная система для грамположительных бактерий из таксонов *Actinobacteria* и *Firmicutes* [4].

Особенностью всех микобактерий является необычное строение их клеточных стенок. По химическому составу, структуре и архитектуре слоев, расположенных над цитоплазматической мембраной эти бактерии относятся к грамположительным, поскольку у них имеется примыкающий к цитоплазматической мембране пептидогликановый слой, но отсутствуют периплазматическое пространство и наружная липопротеиновая мембрана, характерные для грамотрицательных бактерий. Однако в отличие от других грамположительных бактерий у микобактерий, относящихся к отделу *Actinobacteria*, в клеточной стенке муреиновые комплексы чередуются с комплексами из арабиногалактана, к которым присоединены молекулы миколовых кислот, образующие слой толщиной 8–10 нм [2]. В связи с этим эту часть клеточной оболочки называют микомембраной [135].

Белки, секретируемые T7SS системой, отличаются наличием повторяющихся сочетаний либо остатков пролина и глутаминовой кислоты (**PE–белки**), либо двух остатков пролина и глутаминовой кислоты (**PPE – белки**, где E – остаток глутаминовой кислоты) [135]. Изучение геномов микобактерий показало, что они имеют кластеры генов, которые кодируют белки, ассоциированные с мембраной и обладающие АТФазной активностью, обычно участвующие в секреции у других бактерий. Они обозначаются как **ESX** по сокращенной аббревиатуре первого известного представителя этого класса белков ESAT-6 (early secreted antigenic target of 6 kDa ESAT-6 secretion system X). Соответствующие кластеры генов ESX могут повторяться до 5 раз, сочетаясь с генами различных белков из семейств PE и PPE, поэтому их назвали ESX-1-ESX-5 [136]. В 2007 г. было предложено все эти варианты относить к секреции 7 типа [137].

Существенно, что количество ESX-систем достаточно хорошо коррелирует с уровнем патогенности микобактерий. Самые патогенные виды рода *Mycobacterium* (так называемые, медленнорастущие *M. avium*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. tuberculosis* и *M. leprae*) имеют в своем геноме все пять кластеров ESX. Быстрорастущие и менее патогенные *M. smegmatis* и *M. gilvum* имеют только три таких кластера. Было показано, что только совокупность всех пяти вариантов ESX-систем делает штаммы высоко патогенными [137].

Механизм действия и строение секреторного аппарата типа 7 изучены пока недостаточно, присут-

**Таблица 1.** Субстраты, секретируемые системами секреции фитопатогенов и мутуалистов

| Вид | Система секреции бактерий | | | | | | Специализация бактерий | Ссылка |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S1TT | S2TT | S3TT | S4TT | S5TT | S6TT | | |
| *Erwinia* sps. | Металлопротеазы | Целлюлаза, пектатлиаза, полигалактуроназа | Avr- и Dsp-белки харпин hrpJ-белок | | Адгезин HecA; | | Возбудитель мягкой гнили овощей и фруктов | [7], [25], [57] |
| *Rhizobium* sps. | Глюконазы | Целлюлазы пектиназы; белки PrsDE; | NopA–C, NopJ, NopL, NopMNopPNopT, NopX | | | Аналоги VgrG; Hcp | Симбиотический азотфиксатор бобовых | [33], [34], [51], [71], [83], [84], [127] |
| *Sinorhizobi-um meliloti* | Полигалактуроназы | | | | | | Симбиотический азотфиксатор бобовых | [35] |
| *Bradyrizobium japonicum* | Гем цитохрома С | | Белки симбиоза:NopP GunA, Blr1806, Blr1649 | | | Аналоги VgrG; Hcp | Симбиотический азотфиксатор бобовых | [85], [86] |
| *Agrobacterium tumefaciens* | В-1,2-глюкан | | | Бактериальная ДНК; | | Аналоги VgrG; Hcp | Возбудитель рака картофеля | [2] |
| *Xanthomonas sps.* | | Полигалактуроназы PghAxc PghBxc амилаза, эндоглюконаза | Эффектор XopXccN; Эффектор AvrBs3 | Транс-гликозидаза HpaH; эффекторы AvrBs2, XopD, XopN, XopX | Филаментный белок XacFhaB Адгезины XadA, XadBYapH | | Возбудитель мягкой гнили | [63], [64], [98], [127] |
| *Pseudomonas syringae* | | | Эффекторы AvrRpm1; AvrD; HopPtoE; AvrB; | | | Аналоги VgrG Hcp | Возбудитель бактериального ожога растений | [66], [127] |
| *Clavibacter michiganensis* sps. | | Целлюлаза CelA; Пектиназа | Предполагаемые харпины | | | | Возбудитель мокрой гнили картофеля и томатов | [69], [70] |
| *Dickeya Dadantii* | | Целлюлаза, пектатлиаза, Полигалактуроназа | | | Предполагаемые адгезины | Аналоги VgrG Hcp | Возбудитель гнили картофеля | [2], [39], [127] |
| *Xylella fastidiosa* | | | | | Адгезины | | Бактериоз винограда | [120–122] |

ствие последнего обнаружено только у патогенов животных и не будет более подробно рассматриваться в данном обзоре. Однако следует отметить, что вредоносные фитопатогены вида *Clavibacter michiganensis*, относящиеся к грамположительным бактериям, имеют подвиды, паразитирующие на томатах (*C. michiganensis subsp. michiganensis)* и картофеле (*C. michiganensis subsp. sepedonicus*) и являются близкими родственниками рода *Corynebacterium*. Это дает основание надеяться, что компоненты S7TT будут со временем также обнаружены и у данных фитопатогенов.

**Система секреции 8 типа (S8TT).** Эта система секреции, а также 9 система были обнаружены в начале 2000 гг. [138] и имеют весьма локальное распространение. Они найдены только у некоторых видов патогенов животных. Поскольку они пока не обнаружены у фитопатогенов, их характеристики будут описаны кратко. Более подробно о структурных особенностях системы 8 можно прочитать в работах [139–141].

Различные бактерии способны продуцировать уникальный класс функциональных амилоидов, называемых curl (завиток), которые важны для адгезии, образования биопленок и колонизации поверхностей клеток хозяина [141]. Наиболее подробно структура curl изучена у *E. coli*, у которой обнаружен – липопротеиновый компонент, CsgG, формирующий канал секреции в бактериальной наружной мембране для транспортировки ее субъединиц. Структурный анализ субъединицы таких амилоидов показал, что секреция через бактериальную внешнюю мембрану осуществляется в развернутой форме с помощью CsgG.

**Система секреции 9 (T9SS).** Эта система была обнаружена намного позже, чем T8SS и только у некоторых видов грамположительных бактерий *Bacteroidetes*. T9SS играет различные роли в зависимости от условий обитания бактерий. Она обеспечивает либо тип передвижения (так называемое скользящее движение) у свободноживущих почвенных и водных бактерий (*Flavobacterium johnsoniae),* либо поставляет факторы вирулентности патогенам (*Porphyromonas gingivalis*, возбудитель периодонтита человека). У *P. gingivalis* с помощью этой системы транслоцируются факторы вирулентности через внешнюю мембрану клетки [142]. Белки, предназначенные для секреции, несут консервативный С-концевой домен (**CTD**), который направляет белок в транслокон мембраны. По крайней мере 18 белков участвуют в этом все еще загадочном процессе, при этом некоторые из них – в посттрансляционной модификации белков T9SS. После транслокации через внешнюю мембрану CTD удаляется протеазой, обладающей сортазоподобной активностью (сортазы – ферменты, ковалентно пришивающие белки к клеточной стенке после того, как они пройдут внешнюю клеточную мембрану). В результате белок-груз может секретироваться во внеклеточную среду или ковалентно прикрепляться к поверхности бактерий. В настоящее время известно, что T9SS регулируется двухкомпонентной системой, однако точные обстоятельства этого процесса еще не изучены. Более подробные сведения об этой системе можно найти в обзоре [142].

Подводя итог рассмотрению систем секреции факторов вирулентности фитопатогенов и мутуалистов, следует отметить, во-первых, значительно меньшую их изученность по сравнению с системами патогенов животных. Во-вторых, обращает на себя внимание тот факт, что наибольшее разнообразие субстратов для систем секреции сосредоточено у фитопатогенов и мутуалистов в системах S2TT и S3TT (табл. 1). Важно также отметить, что, несмотря на принципиальные различия в специализации, основы построения систем секреции, похожи как у патогенов животных, так и фитопатогенов и мутуалистов растений (рис. 1). Проблема дальнейшего изучения особенностей уже известных систем, а также поиск новых, вероятно, долгое время еще будет оставаться актуальной, поскольку полученные знания могут помочь в поисках способов борьбы с фитопатогенами и, возможно, повысить эффективность симбиоза бактерий с растениями.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Зигангирова Н.А., Нестеренко Л.Н., Тиганова И.Г., Кост Е.А.* // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2012. № 3. С. 1–13.
2. *Chang J.H., Desveaux D., Creason A.L.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. V. 52. № 8. P. 317–345.
3. *Green E.R., Mecsas J.* // Microbiol. Spectr. 2016. V. 4. № 1. P. 1–32.
4. *Schneewind O., Missiakas D.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1687–1698.
5. *Collmer A., Badel J.L., Charkowski A.O., Deng W-L., Derrick E. Fouts D.E., Ramos A.R., Rehm A.H, Anderson D.M., Schneewind O., van Dijk K., Alfano J.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 16. P. 8770–8777.
6. *Schmeisser C., Liesegang H., Krysciak D., Bakkou N., Le Que ´re A., Wollherr A., Heinemeyer I., Morgenstern B., Pommerening-Röse R., Flores M., Palacios R., Brenner S., Gottschalk G., Schmitz R.A., Broughton W.J., Perret X., Strittmatter A.W., Wolfgang R., Streit W.R.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 12. P. 4035–4045.
7. *Akatsuka H., Binet R., Kawai E., Wandersman C., Omori K.* // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 15. P. 4754–4760.
8. *Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D.* // Microb. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 4. P. 692–744.
9. *Johnson T.L., Jan Abendroth J., Hol W.C.J., Sandkvist M.* // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 255. № 2. P.175–186.
10. *Soto M., Sanjua'n J., Olivares J.* // Microbiol. 2006. V. 152. № 10. P. 3167–3174.

11. *Houben E.N.G., Korotkov K.V., Bitter W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 3. P. 1707–1716.
12. *Ho B.T., Tao G. Dong T.G., Mekalanos J.J.* // Cell Host. Microbe. 2014. V. 15. № 1. P. 9–21.
13. *Patel R., Sarah M., Smith S.M., Robinson C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1620–1628.
14. *Bensing B.A., Seepersaud R., Yen Y.T., Sullam P.M.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1674–1686.
15. *Tsukazaki T.* // FEMS Microbiol. Lett. 2018. V. 365. № 18. P. 1–9.
16. *Wu G., Su P., Bo Wang B., Zhang Y., Guoliang Qian G., Liu F.* // Phytopathol. 2017. V. 107. № 9. P. 1011–1021.
17. *Chatzi K.E., Sardis M.F., Economou A., Karamanou S.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1466–1474.
18. *Kuhn A., Kosh H.-G., Dalby R.E.* // EcoSal. Plus. 2017. V. 7. № 2. P. 1–8.
19. *Catipovic M.A., Benedikt W., Bauer B.W., Loparo J., Rapoport T.A.* // EMBO J. 2019. V. 15. pii: e101140.
20. *Rosch J.W., Caparon M.G.* // Mol. Microbiol.2005. V. 58. № 4.P. 959–968.
21. *Poquet I., Saint V., Seznec E., Simoes N., Bolotin A., Gruss A.* // Mol. Microbiol. 2000. V. 35. № 5. P. 1042–1051.
22. *Patel R., Smith S.M., Robinson C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1620–1628.
23. *Khezri J., Ahmadpour F., Talebi S.* // J. Appl. Biotech.Rep. 2016. V. 3. № 3. P. 437–440.
24. *Morgan J.L.W., Acheson J.F., Zimmer J.* // Structure. 2017. V. 25. № 3. P. 522–529.
25. *Thanassi D.G., Hultgren S.J.* // Cur. Opin. Cell. Biology. 2000. V. 12. № 4. P. 420–430.
26. *Fath M.J., Kolter R.* // Microbiol. Rev. 1993. V. 57. № 4. P. 995–1017.
27. *Fauvart M., Michiels J.* // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 285. № 1. P. 1–9.
28. *Krehenbrink M., Downie J.A.* // BMC Genomics. 2008. V. 29. № 1. P. 9–55.
29. *Ghigo J-M., Wandersman C.B.* // J. Biol. Chem. 1994.V. 269. № 12. P. 8979–8985.
30. *Palacios J.L., Zaror I., Martinez P., Ribe F., Opazo P., SociI'as T., Gidekel M., Venegas A.* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 4. P. 1346–1358.
31. *Binet R., Le'toffe S., Ghigo J.M., Delepelaire P., Wandersman C.* // Gene. 1997. V. 192. № 3. P. 7–11.
32. *Linhartova I., Osicka R., Bumba L., Sebo P.* Microbial Toxins / Eds. Gopalakrishnakone P., Stiles B., Alape-Girón A., Dubreuil J.D., Mandal M. Dordrecht: Springer Sci., Business Media B.V., 2018. 502 p.
33. *Finnie C., Hartley N.M., Findlay K.C., Downie J.A.* // Mol. Microbiol. 1997. V. 25. № 1. P. 135–146.
34. *Robledo M., Rivera L., Jiménez-Zurdo J., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch A.M., Mateos P.F.* // Microb. Cell Factories. 2008. V. 11. № 3. P. 125–133.
35. *Hu C.Y., Lin L.P.* // World J. Microb. Biot. 2003. V. 19. № 5. P. 515–522.
36. *Korotkov V., SandkvistM., Hol W.G.J.* // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 10. № 5. P. 336–351.
37. *Nivaskumar M., Francetic O.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1568–1577.
38. *Lallemand M., Login F.H., Guschinskaya N., Pineau C., Effantin G., Robert X., Shevchik V.E.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 11. P. e79562.
39. *Expert D., Patrit O., Shevchk V.E., Perino C., Boucher V., Creze C., Wenes E., Fagard M.* // Mol. Plant. Pathol. 2018. V. 19. № 2. P. 313–327.
40. *Corbett M., Virtue S., Bell K., Birch P., Burr T., Hyman L., Lilley K., Poock S., Toth I., Salmond G.* // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2005. V. 18. № 4. P. 334–342.
41. *Crabill E., Joe A., Block A., van Rooyen J.M., Alfano J.R.* // Plant Physiol. 2010. V. 154. № 1. P. 233–244.
42. *Ozturk G., LeGrand K., Zheng Y., Young GM.* // FEMS Microbiol. Lett. 2017. V. 364. № 20. P. 1–7.
43. *Alfano J.R., Collmer A.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2004. V. 42. № 1. P. 385–414.
44. *Koo J., Ryan P., Lamers R.P., John L. Rubinstein J.L., Burrows L.L., Howell P.L.* // Structure. 2016. V. 24. № 10. P. 1778–1787.
45. *Terashima H., Kawamoto A., Tatsumi C., Namba K., Minamino T., Imada K.* // mBio. 2018. V. 9. № 3. P. 1–13.
46. *Мокрякова М.В., Абдеева И.А., Пирузян Э.С., Шаад Н.В., Игнатов А.Н.* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 1. С. 63–71.
47. *Николайчик Л.Л., Хомская Е.И., Игнатенко Е.И.* // Труды БГУ. 2009. Т. 4. С. 1–7.
48. *Collmer A., Badel J.L., Charkowski A.O, Deng W-L., Derrick E., Fouts D.E., Ramos A.R., Rehm A.H., Anderson D.M., Schneewind O., van Dijk K., Alfano J.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 16. P. 8770–8777.
49. *Puigvert M., Guarischi-Sousa R., Zuluaga P., Coll N.S., MachoA.P., João C., Setubal J.C.,Valls M.* // Fron. Plant Sci. 2017. V. 8. Article 370. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00370
50. *Saad M.M., Staehelin C., Broughton W.J., Deakin W.J.* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 2. P. 750–754.
51. *Nelson M. S., Sadowsky M.J.* // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 491–496.
52. *Büttner D.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2012. V. 76. № 2. P. 262–310.
53. *Hauck P., Roger Thilmony R., He S.Y.* //. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 14. P. 8577–8582.
54. *Bergeron J.R.C., Fernández L., Wasney G.A., Vuckovic M., Reffuveille F., Hancock R.E.W., Natalie C.J., Strynadka N.C.J.* // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. № 4. P. 1676–1691.
55. *Choi M.S., Kim W., Lee C., Oh C.S.* // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2013. V. 26. № 10. P. 1115–1122.
56. *Лагоненко А.Л., Овчинникова Т.В., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н.* // Докл. НАН Беларуси. 2004. Т. 48. № 5. С. 74–78.
57. *Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н.* // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50. № 1. С. 70–75.
58. *Casper-Lindley C., Dahlbeck D., Clark E.T., Staskawicz B.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 12. P. 8336–8342.
59. *Schechter L.M., Roberts K.A., Jamir Y.* // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 2. P. 543–549.
60. *Block A., Alfano J.R.* // Curr. Opin. Microbiol. 2011. V. 14 № 1. P. 39–46.
61. *Ma K-W., Jiang S., Hawara E., Lee D.H., Pan S., Coaker G., Song J., Ma W.* // New. Phytol. 2015 V. 208. № 4. P. 1157–1168.

62. *Han S.W., Hwang B.K.* // Planta. 2016. V. 245. № 2. P. 237–253.
63. *Mou S., Gao F., Shen L., Yang S., He W., Cheng W., Wu Y., He S.* // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. № 1. P. 28–33.
64. *Roden J.A., Belt B., Ross J.B., Tachibana T., Vargas J., Mudgett M.B.* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 47. P. 16624–16629.
65. *Wroblewski T., Caldwell K.S., Piskurewicz U., Cavanaugh K.A., Xu H., Kozik A., Ochoa O., McHale L.K., Lahre K., Jelenska J., Castillo J.A., Blumenthal D., Vinatzer B.A, Greenberg J.T., Michelmore R.W.* // Plant Physiol. 2009. V. 150. № 4. P. 1733–1749.
66. *Madden J.C., Ruiz N., Caparon M.* // Cell. V. 104. № 12. P. 143–152.
67. *Gauthier A., Finlay B.B.* // Cur. Biol. 2001. V. 11. № 3. P. 264–267.
68. *Бояркина С.В., Омеличкина Ю.В., Волкова О.Д., Еникеев А.Г., Верхотуров В.В., Шафикова Т.Н.* // Известия ВУЗОВ. Прикл. хим. биотехнол. 2016. Т. 6. № 3. С. 42–49.
69. *Nissinen R., Lai F-M., Laine M.J., Metzler M.C.* // Phytopathol. 1997. V. 87. № 7. P. 678–684.
70. *Deakin W.J., Broughton W.J.* // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 7. № 4. P. 313–316.
71. *Soto M. J., Sanjua'n J., Olivares J.* // J. Microbiol. 2006. V. 152. № 11. P. 3167–3174.
72. *Songwattana P., Noisangiam R., Teamtisong K., Prakamhang J., Tittabutr P., Piromyou P., Boonkerd N., Eric Giraud E., Teaumroong N.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. article 707. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01810
73. *Gazi A.D., Sarris P.F., Fadouloglou V.E., Charova S.N., Mathioudakis N., Panopoulos N.J.* // BMC Microbiol. 2012. V. 12. № 188. P. 1–15.
74. *Tampakaki A.* // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. article 114. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00114
75. *Kobayashi H., Naciri-Graven Y., Broughton W.J., Perret X.* // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. № 2. P. 335–347.
76. *Wassem R., Kobayashi H., Kambara K., Le Quéré A., C. Walker G.C., Broughton W.J., Deakin W.J.* // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. № 3. P. 736–748.
77. *Skorpil P., Saad M.M., Boukli N.M., Kobayashi H., Ares-Orpel F., Broughton W.J., Deakin W.J.* // Mol. Microbiol. 2005. V. 57. № 5. P. 1304–1317.
78. *López-Baena F.J., Ruiz-Sainz J.E., Rodríguez-Carvajal M.A., Vinardell J.M.* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 5. P. 755–777.
79. *Bartsev A.V., Deakin W.J., Boukli N.M., McAlvin C.B., Stacey G., Malnoë P., Broughton W.J., Staehelin C.* // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 2. P. 871–879.
80. *Ge Y-Y., Qi-WangD., Xiang Q-W., Wagner C., Zhang D., Zhi-Ping O-Y., XieZ-P., Staehelin C.* // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. № 7. P. 2483–2494.
81. *Pedley K.F., Martin G.B.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. № 5. P. 541–547.
82. *Fotiadis T.D., Dimou M., Geograkopoulos D.G., KatinakisP., Tampakaki A.P.* // FEMS Microbiol. Letter. 2012. V. 327. № 1. P. 66–77.
83. *Xin D.W., Liao S., Xie Z.P., Hann D.R., Steinle L., Boller T.* // PLoS Pathog. 2012. 8:e1002707. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002707
84. *Bigeard J., Colcombet J., Hirt H.* // Mol. Plant. 2015. V. 8. № 4. P. 521–539.
85. *Brauer E.K., George V. Popescu G. V., Dharmendra K. Singh D.K.,Calviño N., Gupta K., Gupta B., Chakravarthy S., Popescu S.C.* // *PLoS Biol.* 2018. V. 16. № 12. P. 1–24.
86. *Calviño N., Gupta K., Gupta B., Chakravarthy S., Popescu S.C.* // PLoS Biol. 2018. V. 16. № 12. P. 1–24.
87. *Melville S., Craig L.* // Microb. Mol. Biol. Rev. 2013. V. 77. № 3. P. 323–341.
88. *Oki H., Kawahara K., Maruno T.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 12. P. 7421–7427.
89. *Hamilton H.L., Dillard J.P.* // Mol. Microbiol. 2006. V. 59. № 2. P. 376–385.
90. *Fronzes R., Peter J., Christie P.J., WaksmanG.* // Nat. Rev. Microbiol. 2009. V. 7. № 1. P. 703–714.
91. *Atmakuri K., Cascales E., Christie P.J.* // Mol. Microbiol. 2004. V. 54. № 5. P. 1199–1211.
92. *Waksman G.* // EMBO Rep. 2019. V. 20. № 3. P. 1–16.
93. *Smillie C., Garcillán-Barcia M.P., Francia V., Rocha P.C., de la Cruz F.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010 V. 74. № 3. P. 434–452.
94. *Thoerner C.I., Bin Kingombe K., Bögli-Stuber B., Bissig-Choisat B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi E.T.* // Appl. Environ. Microbiol. 2003 V. 69. № 3. P. 1810–1816.
95. *Lin Y.H., Gao R., Binns A.N., Lynn D.G.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. V. 631. № 1. P. 161–177.
96. *Hubber A.M., Sullivan J.T., Ronson C.W.* // Mol. Plant Microbe. Interact. 2007. V. 20. № 3. P. 255–261.
97. *Vergunst A.C., van Lier M.C.M., den Dulk-Ras A., Stüve T.A.G., Ouwehand A., Hooykaas P.J.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 3. P. 832–837.
98. *Hotson A., Chosed R., Shu H., Orth K., Mudgett M.B.* // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. № 2. P. 377–389.
99. *Schrammeijer B., Risseeuw E., Pansegrau W., Regensburg-Tuïnk T.J., Crosby W.L., Hooykaas P.J.* // Curr. Biol. 2001. V. 11. № 4. P. 258–262.
100. *Shi Y., Lee L.Y., Gelvin S.B.* // Plant J. 2014. V. 79. № 5. P. 848–860.
101. *Jahnig J.J.F., Meyer T.F.* // Mol. Microbiol. 1995. V. 18. № 2. P. 378–380.
102. *Leo J.C., Grin I., Linke D.* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2012. V. 367. № 4. P. 1088–1101.
103. *Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 12. P. 692–744.
104. *Szabady R.L., Peterson J.H., Skillman K.M., Bernstein H.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 1. P. 221–226.
105. *Ulsen P., Rahman S.,Wouter S.P., Jong W.S.P., Daleke-Schermerhorn M.H., Luirink J.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 3. P. 1592–1611.
106. *Fan E., Chauhan N., Udatha D.B.R.K., Leo J.C., Linke D.* // Microbiol. Spectrum. 2016. V. 4. № 1. P. 1–24.
107. *Andrade F.B., Abreu A.G., Nunes K.O., Gomes T.A.T., Piazza R.M.F., Elias W.P.* // Infect. Genet. Evol. 2017. V. 50. № 6. P. 83–86.
108. *Spahich N.A., Geme J.W.St.* // Front. Cell Infect. Microbiol. 2011. V. 1. Article 5. https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00005
109. *Coutte L., Antoine R., Drobecq H., Jacob-Dubuisson F.* // EMBO J. 2001. V. 20. № 8. P. 5040–5048.
110. *Wilhelm S., Gdynia A., Tielen P., Rosenau F., Jaeger K.E.* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 18. P. 6695–6703.

111. *Foegeding N.J., Caston R.R., McClain M.S., Ohi M.D., Cover T.L.* // Toxins (Basel). 2016. V. 8. № 5. P. 173–177.
112. *Bernstein H.D.* // Eco. Sal. Plus. 2019. V. 8. № 1. P. 10–15.
113. *Ma Q., Zhai Y., Schneider J.C., Ramseier T.M., Saier M.N.* // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1611. № 1–2. P. 223–233.
114. *Nummelin H., Merckel M.C., Leo J.C., Lankinen H., Skurnik M., Goldman A.* // EMBO J. 2004.V. 23. № 4. P. 701–711.
115. *Salacha R., Kovacić F., Brochier-Armanet C., Wilhelm S., Tommassen J., Filloux A., Voulhoux R., Bleves S.* // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. № 6. P. 1498–1512.
116. *Fairman J.W., Dautin N., Wojtowicz D., Liu W., Noina N.J., Barnard T.J., Udho E., Przytycka T.M., Cherezov V., Buchanan S.K.* // Structure. 2012. V. 20. № 7. P. 1233–1243.
117. *Lai Y., Rosenshine I., Leong J., Frankel G.* // Cell. Microbiol. 2013. V. 15. № 11. P. 1796–1808.
118. *Heinz E., Christopher J. Stubenrauch C.J., Grinter R., Nathan P. Croft N.P., Purcell A.V., Strugnell R.A., Dougan G., Lithgow T.* // Genome. Biol. Evol. 2016. V. 8. № 6. P. 1690–1705.
119. *Walker D., Lancaster L., James R., Kleanthous C.* // Protein Sci. 2004. V. 13. № 1. P. 1603–1611.
120. *Gottig N., Garavaglia B.S., Garofalo C.G., Orellano E.G., Ottado J.* // PLoS ONE. 2009. V. 4. № 2. P. e4358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004358
121. *Voegel T.M., Warren J.G., Matsumoto A., Igo M.M., Kirkpatrick B.C.* // Microbiol. 2010. V. 156. № 5. P. 2172–2179.
122. *Katsumoto A., Huston S.L., Killiny N., Igo M.M.* // Microbiol. Open. 2012. V. 1. № 1. P. 33–45.
123. *Ruhe Z.C., Low D.A., Hayes C.S.* // Trends Microbiol. 2013. V. 21. № 2. P. 230–237.
124. *Sarris P.F., Skandalis N., Kokkinidis M., Panopoluos N.P.* // Mol. Plant Pathol. 2010. V. 11. № 6. P. 795–804.
125. *Silverman J.M., Brunet Y.R., Cascales E., Mougous J.D.* // Annu. Rev. Microbiol. 2012. V. 66. № 4. P. 453–472.
126. *Ho B. T., Dong T. G., Mekalanos J.J.* // Cell Host Microbe. 2014. V. 15. P. 9–21.
127. *Ryu C.-M.* // J. Microbiol. 2015. V. 53. № 3. P. 201–208.
128. *Thomas J., Watve S.S., Ratcliff W.C., Hammer B.K.* // mBio. 2017. V. 25. № 8. P. e00654-17. https://doi.org/10.1128/mBio.00654-17
129. *Silverman J.M., Agnello D.M., Zheng H., Andrews B.T., Li M., Catalano C.E., Gonen T., Mougous J.D.* // Mol. Cell. 2013. V. 51. № 5. P. 584–593.
130. *Zong B., Zang Y., Wang X., Liu M., Zhang T., Zhu Y., Zheng Y., Hu L., Li P., Chen H., Tan C.* // Virulence. 2019. V. 10. № 1. P. 118–132.
131. *Decoin V., Barbey C., Bergeau D., Latour X., Feuilloley M.G.J., Orange N., Merieau A.* // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. P. e89411. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089411
132. *Bladergroen M.R., Badelt K., Spaink H.P.* // Mol. Plant Microbe. Interact. 2003. V. 16. № 1. P. 53–64.
133. *Bingle L.E., Bailey C.M., Pallen M.J.* // Curr. Opin. Microbiol. 2008. V. 11. № 1. P. 1–6.
134. *Houben E. N.G., Korotkov K.V., Bitter W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. № 8. P. 1707–1716.
135. *Dalekea M.H., Ummelsa R., Bawonoc P., Heringac J., Vandenbroucke-Graulsa C.M., Luirinkb J., Bittera W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 28. P. 11342–11347.
136. *Bottai D., Gröschel M.I., Brosch R.* // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2017. V. 404. № 4. P. 235–265.
137. *Ates L.S., Houben E.N., Bitter W.* // Microbiol. Spectrum. 2016. V. 4. № 1. P. 1–21.
138. *Chapman M.R., Robinson L.S., Pinkner J.S., RothR., Heuser J., Hammar M., Norm S.* // Science. 2002. V. 295. № 8. P. 851–855.
139. *Gibson D.L., White A.P., Rajotte C.M., Kay W.W.* // Microbiol. 2007. V. 153. № 4. P. 1131–1140.
140. *Cao B., Zhaoa Y., Koua Y., Nia D., Zhanga X.C., Huanga Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 50. P. E5439–E5444.
141. *Depluverez S., Devos S., Devreese B.* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. article 1336–1339. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01336
142. *Lasica A.M., Ksiazek M., Madej K.M., Potempa M.* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017. V. 7. article 215. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00215

# Secret Systems of Bacterial Phytopathogens and Mutualists (Review)

**L. A. Lomovatskaya[a] and A. S. Romanenko[a, *]**

[a]*Siberian Institute of Plant Physiology and& Biochemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, 664033 Russia*

**e-mail: rom@sifibr.irk.ru*

Received April 1, 2019; revised September 9, 2019; accepted October 1, 2019

The review presents the current state of research on the structural and functional features of the secretion systems of phytopathogens and mutualists, as well as their importance in the suppression of phytoimmunity. Currently, nine protein secretion systems are isolated from bacteria through cell membranes, which differ significantly in the complexity of their functioning. Most of the data on such systems was obtained on animal pathogens, while phytopathogens, and even more so on the bacterial species, have been devoted to only a few works that do not give a general idea of their role in the realization of virulence, as well as their similarities and differences with similar systems in bacterial pathogens animals.

*Keywords:* secretion systems, phytopathogens, microsymbionts, secretion substrates

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 123–134

УДК 577.29;577.2.08;575.22;579.84

# БИОЧИП ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ И КАРБАПЕНЕМАЗ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

**© 2020 г. М. Ю. Рубцова[1, *], М. М. Уляшова[1], Ю. И. Поболелова[1], Г. В. Преснова[1], А. М. Егоров[1]**

[1]*Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, 119991 Россия*

**e-mail: mrubtsova@gmail.com*

Поступила в редакцию 05.09.2019 г.
После доработки 15.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Бактериальные бета-лактамазы и карбапенемазы обуславливают устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к классу бета-лактамных антибиотиков, включающих пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. Их широкое распространение среди бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных представляет глобальную угрозу. Разработан биочип с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена для одновременной идентификации генов всех клинически значимых бета-лактамаз класса А и карбапенемаз классов A, B и D. На биочипе также определялись 25 замен в нуклеотидной последовательности бета-лактамаз класса А, кодирующие их ключевые замены аминокислотных остатков. Оптимизированы условия аллель-специфической гибридизации меченных биотином ДНК-мишеней с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности биочипа. Для получения ДНК-мишеней разработан метод мультиплексной амплификации всех исследуемых генов в одной реакции с одновременным введением биотина. Апробация биочипа проведена с использованием смесей генов бета-лактамаз и карбапенемаз, а также 68 образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных бактерий. Общее время анализа образца ДНК составляло ~4 ч. Продемонстрирована высокая специфичность идентификации комбинаций генов исследуемых ферментов, что может быть использовано для исследования мультирезистентных бактерий.

*Ключевые слова:* биочип, бета-лактамазы, карбапенемазы, гибридизационный анализ ДНК, мультиплексная ПЦР, пероксидаза, колориметрическая детекция

**DOI:** 10.31857/S0555109920020129

С момента открытия и до настоящего времени бета-лактамные антибиотики являются наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами для лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы. Однако широкое распространение бактерий, устойчивых к данному классу антибиотиков, признано глобальной угрозой и существенно ограничивает возможности химиотерапии [1–3]. Основным механизмом устойчивости грамотрицательных бактерий к бета-лактамам является продукция ферментов бета-лактамаз (КФ 3.5.2.6), гидролизующих бета-лактамное кольцо антибиотиков [4]. С каждым годом стремительно растет количество известных бета-лактамаз, и к настоящему времени описано около 2800 различных представителей этого суперсемейства ферментов, которые подразделяют на четыре молекулярных класса A, B, C и D [4, 5]. Ферменты классов A, C и D содержат остаток серина в каталитическом активном центре, а ферменты класса B являются металло-бета-лактамазами. В настоящее время наибольшую опасность представляют бета-лактамазы расширенного спектра (**БЛРС**), способные расщеплять пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений, а также карбапенемазы (КФ 3.5.2.6), гидролизующие наряду с пенициллинами и цефалоспоринами самые новые антибиотики класса бета-лактамов – карбапенемы.

Наиболее распространенные БЛРС относятся к трем типам (TEM, SHV и CTX-M), причем все они представлены сериновыми гидролазами класса A. Внутри каждого типа ферментов присутствует ограниченное число аминокислотных мутаций, называемых ключевыми и влияющих на каталитические свойства, субстратную специфичность и устойчивость ферментов к ингибиторам бета-лактамной природы (клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму) [6]. У бета-лактамаз TEM типа к клю-

чевым относят замены аминокислотных остатков в положениях 69, 130, 104, 164, 238, 240, 244, 275 и 276, у бета-лактамаз SHV типа – 35, 69, 130, 179 и 234, 238, 240, у CTX-M типа – 167 и 240. Большинство этих замен кодируется единичными заменами в нуклеотидной последовательности генов, то есть однонуклеотидным полиморфизмом (**ОНП**).

В отличие от бета-лактамаз класса A карбапенемазы разнообразны по своему строению и относятся к трем молекулярным классам A, B и D [4, 7]. Среди сериновых карбапенемаз класса A наиболее распространенными являются ферменты KPC типа [8]. Эти ферменты гидролизуют практически все группы бета-лактамных антибиотиков: пенициллины, цефалоспорины всех поколений, карбапенемы и азтреонам, что обусловлено структурой активного центра и расположением каталитического остатка серина таким образом, что он доступен для различных субстратов [9].

Молекулярный класс B объединяет все металло-бета-лактамазы (**МБЛ**), в активном центре которых присутствуют один или два иона $Zn^{2+}$ [10]. Данные ферменты характеризуются высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все бета-лактамные антибиотики за исключением монобактамов. МБЛ нечувствительны к ингибиторам бета-лактамной природы, а ингибируются только хелатирующими агентами, например, ЭДТА. Наиболее распространенными типами карбапенемаз являются VIM и IMP, которые на основании гомологии последовательностей разделяются на три и пять субкластеров соответственно.

В 2007 г. были впервые обнаружены новые МБЛ, относящиеся к NDM типу и гидролизующие все классы бета-лактамных антибиотиков, за исключением монобактамов [11], а уже к 2012 г. эти ферменты были найдены у бактерий, присутствующих на всех континентах земного шара. Бактерии, продуцирующие данные МБЛ, как правило, относятся к мульти- и пан-резистентным, поскольку на плазмидах, несущих ген $bla_{NDM}$, всегда располагается комплекс интегрона класса 1, включающий комплекс других генов устойчивости к бета-лактамам (гены карбапенемаз KPC, OXA, VIM типов, БЛРС и бета-лактамаз класса C), макролидам (гены эритромицинэстеразы), аминогликозидам (гены 16S метилазы), хинолонам (гены Qnr), тетрациклинам (гены системы эффлюкса), сульфонамидам (гены дигидроптероатсинтетазы) и рифампицину (гены рифампицин-модифицирующих ферментов) [12, 13].

Среди карбапенемаз OXA типа класса D выделяют 5 субкластеров: OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-48 и OXA-58. Их субстратная специфичность сильно различается, но, в основном, они гидролизуют карбапенемы, пенициллины и цефалоспорины I поколения (цефалотин и цефалоридин) [14].

В настоящее время появление множественной устойчивости к нескольким и даже практически ко всем существующим антибактериальным препаратам привело к появлению мультирезистентных, экстремально резистентных и пан-резистентных штаммов [12, 15]. При этом наблюдается экспоненциальный рост устойчивости как среди возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных), так и внебольничных инфекций. Обнаружены бактерии, продуцирующие одновременно несколько бета-лактамаз класса A совместно с карбапенемазами различных классов. Появление множественной устойчивости возбудителей одновременно к нескольким типам антибиотиков существенно ограничивает выбор адекватной лекарственной терапии. Для рационального применения антибактериальных препаратов необходимо понимание молекулярных механизмов индукции резистентности и наличие адекватных высокотехнологичных методов ее идентификации.

В связи с многообразием и опасностью широкого распространения бета-лактамаз и карбапенемаз становится актуальной задача поиска надежных методов их диагностики. В настоящее время для этих целей, в основном, используются микробиологические тесты [16]. Однако они длительны по времени (24–72 ч) и малоэффективны при определении карбапенемаз. При этом трактовка их результатов часто неоднозначна, особенно в случаях, когда наблюдается одновременная продукция нескольких типов бета-лактамаз и карбапенемаз. В последние годы активно развиваются молекулярно-генетические методы идентификации генов бета-лактамаз, включающие амплификацию нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (**ПЦР**), ПЦР в реальном времени (**ПЦР РВ**) и методы молекулярной гибридизации [18–20]. К их недостаткам можно отнести необходимость проведения множества параллельных процессов амплификации для увеличения количества определяемых типов генов. Как правило, подразделения гетерогенных типов ферментов на субкластеры не проводятся.

Перспективными для одновременного определения множества генов в одном анализе являются методы анализа ДНК на биочипах [21–23]. Данная технология характеризуется высокой производительностью и позволяет проводить анализ в малом объеме реакционной смеси, что снижает расход реагентов и стоимость анализа в целом. В предыдущей работе [24] был разработан метод гибридизационного анализа ДНК на биочипах с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена. При этом на поверхности мембранного носителя образуется нерастворимый окрашенный продукт, определение интенсивности окраски которого

проводится с использованием оптического сканера высокого разрешения. Данный биочип был использован для определения генов трех типов БЛРС (TEM, SHV и CTX-M), относящихся к классу А.

Цель работы – разработка метода одновременной идентификации трех типов генов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV, CTX-M) и восьми типов генов карбапенепаз (KPC, NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM и OXA) путем гибридизационного анализа на биочипах с колориметрической детекцией.

## МЕТОДИКА

Набор праймеров для ПЦР и амино-модифицированные олигонуклеотидные зонды синтезированы в "Синтол" (Россия). Образцы ДНК, выделенных из культур контрольных штаммов микроорганизмов-продуцентов бета-лактамаз и карбапенемаз, а также образцы ДНК, выделенных из клинических образцов возбудителей внутрибольничных инфекций, были предоставлены сотрудниками НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (Смоленск, Россия) и НИИ нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко (Москва, Россия).

Иммобилизацию олигонуклеотидных зондов на поверхности биочипов из нитроцеллюлозы BioTrace NT ("Pall Corporation", США) проводили как описано в работе [24]. Структуры зондов для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз класса А и определения ОНП в них были описаны ранее [24, 25]. Амплификацию исследуемых генов с одновременным включением в качестве метки биотина проводили в процессе мультиплексной ПЦР: общий объем смеси составлял 25 мкл и содержал: 5 мкл 5 × KAPA2G буфер M, 2 мМ хлорид магния, KAPA2G Fast HotStart ДНК-полимераза ("KAPA Biosystems", США), по 100 мкМ dATP, dGTP и dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-12-биотин ("ДНК-синтез", Россия), по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров (список и структуры праймеров приведены в табл. 1) и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler gradient ("Eppendorf", Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 30 циклов амплификации (10 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 65°C, 10 с – элонгация при 72°C), 2 мин – завершающий этап элонгации при 72°C.

Для фрагментации меченые ПЦР-продукты растворяли до концентрации 30 нг/мкл в реакционном буфере (40 мМ Трис-HCl, pH 8.0, содержащий 10 мМ $MgSO_4$ и 1 мМ $CaCl_2$,) и добавляли ДНКазу I (0.5 мЕд./1 нг ДНК) ("Fermentas", Германия). Инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем добавляли 3 мМ ЭДТА и дополнительно инкубировали в течение 10 мин при 65°C. Размер полученных фрагментов составлял 50–150 п.н. 750 нг меченой фрагментированной ДНК растворяли в гибридизационном буфере 2xSSPE, pH 7.4, содержащем 0.02 М $NaH_2PO_4$, 0.002 М ЭДТА, 0.3 М NaCl и 1.6 пмоль/мл контрольного меченного биотином олигонуклеотида (положительный контроль гибридизации). Биочип помещали в гибридизационную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в термомиксере Thermomixer Comfort ("Eppendorf", Германия) в течение 1 ч при 45°C. После гибридизации мембраны отмывали два раза по 15 мин при комнатной температуре фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0.05% Твина 20 (**ФСБТ**). Для детекции результатов гибридизации микрочипы инкубировали в течение 30 мин при 37°C в растворе (1 мкг/мл) конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена ("Имтек", Россия) в ФСБТ, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Микрочипы отмывали при перемешивании ФСБТ (10 мин) и ФСБ (10 мин) при комнатной температуре и помещали на 10 мин в субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5-тетраметилбензидин (**ТМБ**), $H_2O_2$ ("НВО Иммунотех", Россия) и декстран сульфата натрия ("Sigma-Aldrich", США) до конечной концентрации 0.5% (по массе). После высушивания биочипы сканировали на сканере Perfection V750 Pro ("Epson", Германия) при разрешении 4800 dpi. Полученные изображения в формате tiff обрабатывали количественно с использованием программы Scan Array Express ("PerkinElmer", version 3.0, Германия). Аналитическим сигналом являлась интенсивность окрашивания зоны биочипа. Сигнал принимался значимым, если средняя интенсивность превышала интенсивность фонового окрашивания более, чем на 5 величин стандартного отклонения. Принцип определения нуклеотида в позиции ОНП и кодируемой аминокислотной замены описан в работе [24].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Совместная амплификация генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР.** Для получения ДНК-мишеней всех исследуемых генов был разработан метод одновременной амплификации генов трех типов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV и CTX-M) и восьми типов карбапенемаз классов А, В, и D (KPC, NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM и OXA) в процессе одной мультиплексной ПЦР. Для реакции амплификации было использовано 18 пар праймеров (табл. 1). Поскольку гены, кодирующие бета-лактамазы CTX-M типа и карбапенемазы OXA типа, достаточно разнородны, они были разделены на основании гомологии нуклеотидных последовательностей на 4 и 5 кластеров соответственно. Для каждого генетического кластера была подо-

**Таблица 1.** Последовательность и характеристики праймеров для амплификации генов бета-лактамаз и карбапенемаз в мультиплексной ПЦР

| Тип фермента | | Последовательность праймера, 5' → 3' | Длина, нукл. | GC, % | $T_{пл.}$, °C | Длина ампликона, п.н. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TEM | Пр | ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC | 24 | 37.5 | 63.0 | 851 |
| | Об | TTAATCAGTGAGGCACCTATCTC | 23 | 43.5 | 63.0 | |
| SHV | Пр | TTATATTCGCCTGTGTATTATCTC | 24 | 33.3 | 60.0 | 856 |
| | Об | GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG | 20 | 60.0 | 67.0 | |
| CTX-M-1 | Пр | ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAG | 24 | 41.7 | 66.0 | 869 |
| | Об | CCGTCGGTGACGATTTTAGCCG | 22 | 59.1 | 68.2 | |
| CTX-M-2 | Пр | ATGATGACTCAGAGCATTCGCC | 22 | 50.0 | 66.0 | 869 |
| | Об | CCGTGGGTTACGATTTTCGCCG | 22 | 59.1 | 68.8 | |
| CTX-M-8 | Пр | ATGATGAGACATCGCGTTAAGC | 22 | 45.5 | 64.4 | 869 |
| | Об | CCGTCGGTGACGATTTTCGCG | 21 | 61.9 | 68.8 | |
| CTX-M-9 | Пр | GGTGACAAAGAGAGTGCAACGG | 22 | 54.5 | 66.7 | 868 |
| | Об | CCCTTCGGCGATGATTCTCGC | 21 | 61.9 | 68.3 | |
| IMP | Пр | GAAGG(C/T)GTTTATGTTCATAC(T/A)TCG | 24 | 37.5–41.7 | 61.5–63.4 | 586 |
| | Об | GTA(A/C)G(T/C)TTCAGAG(T/C)GA(T/C)GC(G/A)TC | 23 | 43.3–52.2 | 63.1–66.7 | |
| VIM | Пр | GATGGTGTTTGGTCGCATATCGC | 23 | 52.2 | 67.1 | 505 |
| | Об | CATTC(A/T)GCCAGATCGGCATCG | 21 | 57.1 | 66.6 | |
| SPM | Пр | CGTTTTGTTTGTTGCTCGTTGCG | 23 | 47.8 | 67.2 | 643 |
| | Об | CACATTGGCATCTCCCAGATAACC | 24 | 50.0 | 66.3 | |
| SIM | Пр | GTTTGCGGAAGAAGCCCAGCCAG | 23 | 60.9 | 70.8 | 588 |
| | Об | GTCTCCGATTTCACTGTGGCTTGGG | 25 | 56.0 | 69.7 | |
| GIM | Пр | CTTGTAGCGTTGCCAGCTTTAGCTCG | 26 | 53.8 | 70.0 | 614 |
| | Об | CTGAACTTCCAACTTTGCCATGCCCC | 26 | 53.8 | 70.7 | |
| NDM | Пр | CTTCCTATCTCGACATGC | 18 | 50.0 | 58.3 | 503 |
| | Об | CGTAGTGCTCAGTGTCG | 17 | 58.8 | 60.7 | |
| KPC | Пр | TTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGG | 23 | 47.8 | 65.5 | 801 |
| | Об | CCTCGCTGTGCTTGTCATCC | 20 | 60.0 | 66.5 | |
| OXA-23 | Пр | GAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAG | 25 | 48.0 | 66.5 | 689 |
| | Об | GGCATTTCTGACCGCATTTCC | 21 | 52.4 | 65.7 | |
| OXA-40 | Пр | GTTTCTCTCAGTGCATGTTCATC | 23 | 43.5 | 63.2 | 713 |
| | Об | CATTTCTAAGTTGAGCGAAAAGGGG | 25 | 44.0 | 65.4 | |
| OXA-51 | Пр | CGAAGCACACACTACGGGTG | 19 | 60.0 | 66.2 | 648 |
| | Об | CTCTTTTCGAACAGAGCTAGGTATTC | 26 | 42.3 | 64.2 | |
| OXA-58 | Пр | CTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTC | 24 | 45.8 | 64.1 | 684 |
| | Об | CCACTTGCCCATCTGCCTTTTC | 22 | 54.5 | 67.3 | |
| OXA-48 | Пр | GCGTGTATTAGCCTTATCGGC | 21 | 52.4 | 64.3 | 672 |
| | Об | CCACACATTATCATCAAGTTCAACC | 25 | 40.0 | 63.7 | |

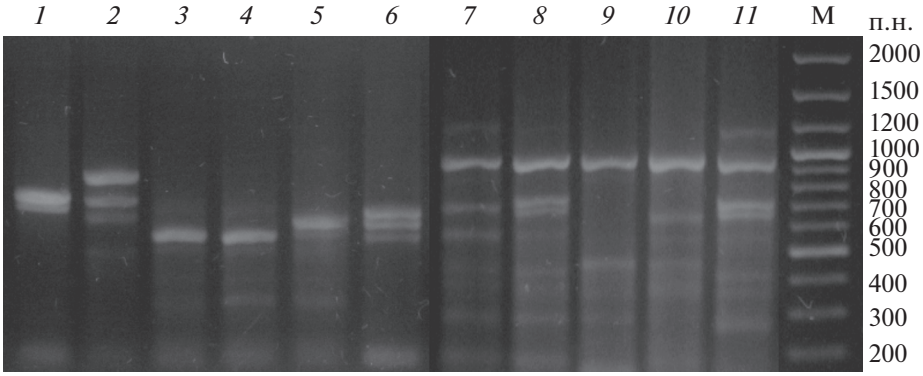


**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР: *1* – OXA-40, *2* – OXA-48, *3* – VIM-1, *4* – VIM-2, *5* – IMP-1, *6* – IMP-2, *7* – TEM-1, *8* – SHV-5, *9* – SHV-18, *10* – CTX-M-15, *11* – CTX-M-3, M – ДНК-маркеры.

брана пара специфических праймеров. Результаты электрофореза продуктов амплификации исследуемых генов в 1%-ном агарозном геле показаны на рис. 1. Все целевые гены бета-лактамаз и карбапенемаз удалось амплифицировать с достаточным для дальнейшей гибридизации выходом (не менее 40 нг ДНК/мкл). При амплификации практически всех генов наблюдали образование неспецифических продуктов амплификации. Оптимизация температуры стадии отжига праймеров и времени проведения каждой стадии реакции амплификации позволила сократить общее время реакции до 40 мин.

**Влияние условий гибридизации на специфичность гибридизации идентификационных зондов**. Для одновременной идентификации разнородных генов бета-лактамаз и карбапенемаз в одном анализе, включая одновременное определение единичных замен в генах бета-лактамаз класса А, была проведена оптимизация условий гибридизационного анализа ДНК-мишени с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности биочипа. Целью оптимизации было повышение специфичности определения генов каждого типа, поскольку ДНК-мишени содержали побочные продукты амплификации. Было изучено влияние температуры гибридизации и солевого состава гибридизационного буфера, которые относятся к параметрам, наиболее существенно влияющим на специфичность определения ДНК в гибридизационном анализе. На биочипах с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами проводили гибридизацию 300 нг биотинилированной ДНК, амплифицированной из контрольных штаммов-продуцентов бета-лактамаз, в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. Далее определяли интенсивность сигналов гибридизации ДНК-мишени каждого типа бета-лактамаз со специфическими для них зондами, а уровень неспецифической гибридизации определяли по интенсивности сигналов гибридизации данной ДНК-мишени с зондами для других типов и субклассов бета-лактамаз.

**Выбор оптимальной температуры гибридизации**. При выборе температуры гибридизации основным критерием являлось то, что она должна быть ниже температуры плавления ($T_m$) образующихся гетеродуплексов между комплементарным зондом и ДНК-мишенью. Диапазон исследованных температур гибридизации составил от 40 до 50°C и не превышал $T_m$ отдельных олигонуклеотидных зондов, а также ограничивался температурой, при которой наблюдали высокий уровень неспецифической гибридизации. Выборочные данные по гибридизации генов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV и CTX-M типов) и карбапенемаз (VIM и OXA типов) с иммобилизованными на биочипах специфическими идентификационными зондами, полученные при разных температурах гибридизации, представлены на рис. 2.

Анализ полученных результатов показал, что абсолютные интенсивности сигналов были выше при более низких температурах и уменьшались с увеличением температуры. При проведении гибридизации при 40°C абсолютная интенсивность сигналов оказалась высокой (для большинства зондов она превышала 25000 усл. ед.), однако при этом ряд наборов зондов, определяющих единичные замены в генах TEM бета-лактамаз, показывали низкую дискриминирующую способность. Для генов подгрупп CTX-M бета-лактамаз и IMP карбапенемаз при этой температуре наблюдалась сильная перекрестная гибридизация с наборами зондов других подгрупп (на диаграмме приведено значение для неспецифической гибридизации с наибольшей интенсивностью сигнала). При проведении гибридизации при 50°C интенсивность гибридизационных сигналов в целом была низкой и определение единичных замен, соответствующих мутациям аминокислотных остатков в позициях 69, 104 и 130 у TEM бета-лактамаз и в

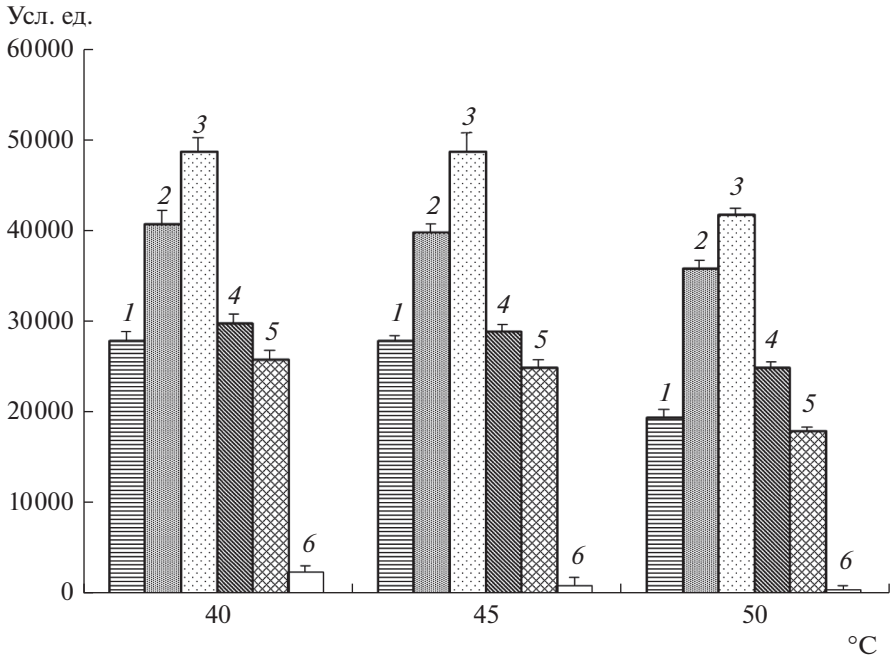


**Рис. 2.** Влияние температуры гибридизации (°C) на интенсивность окрашивания зоны биочипа (усл. ед.) при гибридизационном анализе генов бета-лактамаз (*1* – TEM-1, *2* – SHV-1, *3* – CTX-M-15), карбапенемаз (*4* – VIM-1, *5* – OXA-51) и неспецифической гибридизации (*6*).

позициях 69, 130 и 238/240 у SHV бета-лактамаз, оказалось невозможным. В качестве оптимальной температуры для проведения гибридизации было выбрано 45°C.

**Выбор концентрации NaCl в гибридизационном буфере**. Результат гибридизации олигонуклеотидных зондов с ДНК-мишенью зависел также от концентрации соли в гибридизационном буфере. Влияние концентрации NaCl на результат гибридизации изучали на двух вариантах генов карбапенемаз (IMP-1 и VIM-1) и двух различных генах бета-лактамаз класса A (SHV-1 и CTX-M-15). Гибридизацию проводили при 45°C. На рис. 3 показаны выборочно результаты гибридизации ДНК-мишени со специфическими зондами, полученные при использовании гибридизационного буфера с различным содержанием NaCl. Увеличение концентрации соли приводило до определенной ее концентрации к увеличению наблюдаемых интенсивностей гибридизационных сигналов вследствие уменьшения взаимного отталкивания заряженных фосфатных групп двух нуклеотидных цепей. Однако при использовании буфера с высокой концентрацией соли (1 M) специфичность реакции гибридизации падала. Для идентификации единичных замен в генах при проведении гибридизации при низкой концентрации соли в гибридизационном буфере (30 мМ) интенсивность гибридизационных сигналов была очень низкой, при этом не наблюдалось гибридизационных сигналов для более чем 50% наборов зондов. Это свидетельствовало о том, что в гибридизационной смеси оказывалось недостаточно содержания ионов натрия, чтобы полностью экранировать отрицательные заряды сахарофосфатных остовов олигонуклеотидных зондов и ДНК-мишеней, и между ними при гибридизации действовали силы электростатического отталкивания. Увеличение содержания ионов натрия в гибридизационной смеси приводило к увеличению интенсивности гибридизационных сигналов, которые достигали максимальных значений при 0.3–1.0 M NaCl, и при этом выявлялось максимальное количество точечных замен в генах. Однако следует отметить, что интенсивность сигналов неспецифической гибридизации также возрастала. При этом для большинства наборов зондов значения неспецифической гибридизации увеличивались в большей степени, чем увеличение специфических сигналов, что в результате снижало специфичность выявления нуклеотидов. Таким образом, концентрация NaCl, соответствующая 0.3 M, была оптимальной для наиболее удачного соотношения эффективности и специфичности гибридизации.

**Биочип для одновременной идентификации генов бета-лактамаз класса A и карбапенемаз.** Для одновременной идентификации генов бета-лактамаз класса A (трех типов: TEM, SHV и CTX-M), карбапенемаз (восьми типов: KPC, NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM и OXA) был проведен дизайн биочипа, который заключался в выборе количества специфических зондов для идентифика-

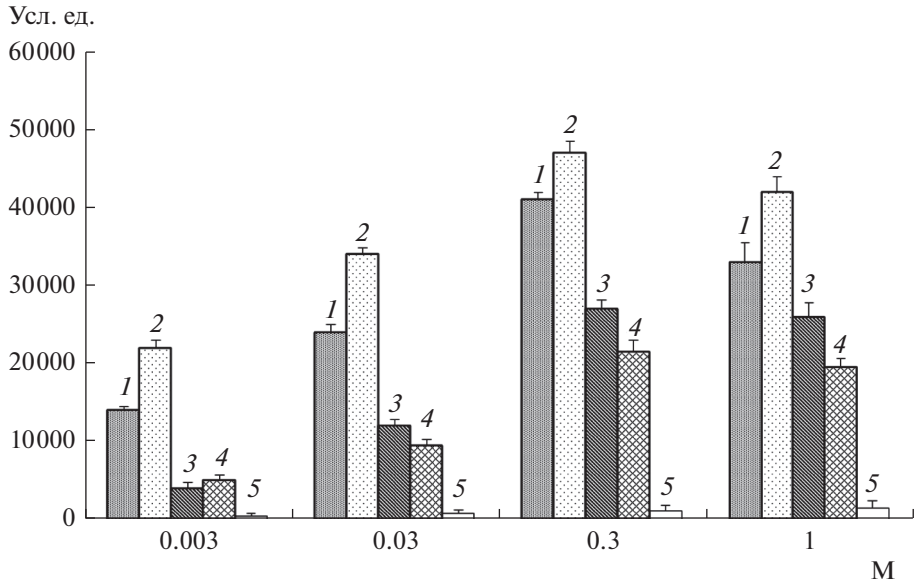


**Рис. 3.** Влияние концентрации NaCl (M) на интенсивность окрашивания зоны биочипа в гибридизационном анализе генов бета-лактамаз (*1* – SHV-1, *2* – CTX-M-15), карбапенемаз (*3* – VIM-1, *4* – IMP-1) и неспецифической гибридизации (*5*).

ции выбранных типов генов с учетом определения субкластеров и необходимого количества контрольных зондов, а также размещения зондов в необходимом количестве повторов.

Подобраны структуры зондов для идентификации отдельных субкластеров генов бета-лактамаз CTX-M типа (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 и CTX-M-9), карбапенемаз VIM типа (VIM-1, VIM-2 и VIM-7), IMP типа (IMP-1, IMP-2, IMP-5, IMP-11 и IMP-14), OXA типа (OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-51 и OXA-58). Биочип включал олигонуклеотидные зонды для определения 15 позиций ОНП, кодирующих ключевые мутации в бета-лактамазах TEM и SHV типов, обуславливающих изменение профиля субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам (8 позиций в бета-лактамазах TEM типа, 7 – в бета-лактамазах SHV типа). Также биочип включал зонды для определения 10 позиций ОНП для идентификации бета-лактамаз внутри отдельных субкластеров (2 – в бета-лактамазах субкластера CTX-M-1, 5 – в бета-лактамазах субкластера CTX-M-2 и 3 – в бета-лактамазах субкластера CTX-M-9), поскольку они наиболее распространены в РФ и других странах [26]. Схема расположения олигонуклеотидных зондов на поверхности биочипа представлена на рис. 4.

Помимо специфических зондов каждый биочип содержал 3 типа контрольных олигонуклеотидных зонда. Каждый зонд наносился в 3 повторах.

Биочип имел следующие размеры: 14 × 12 мм, зоны биочипа расположены в виде матрицы 21 × 18, общее количество зон 378, диаметр одной зоны с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом составлял ~ 350 мкм, расстояние между центрами соседних зон ~ 500 мкм.

**Тестирование смесей генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз на биочипе.** Возможность одновременной детекции генов различных бета-лактамаз и карбапенемаз была изучена на искусственно приготовленных смесях ДНК различных бета-лактамаз. Предварительно было проведено сравнение результатов гибридизации продуктов амплификации изучаемых генов (по одному варианту для каждого типа генов) со специфическими праймерами и в процессе мультиплексной ПЦР. Для этого ДНК-мишени исследуемых ферментов, меченные биотином, были получены методом специфической ПЦР с одной парой специфических праймеров и методом мультиплексной ПЦР со смесью 18 пар праймеров. Несмотря на то, что мультиплексная ПЦР сопровождалась синтезом побочных продуктов реакции (рис. 1), было показано, что специфичность идентификации генов бета-лактамаз и карбапенемаз в гибридизационном анализе на биочипах оказалась одинаково высокой для всех исследованных ДНК-мишеней, полученных в ПЦР с одной парой специфических праймеров и в процессе мультиплексной ПЦР.

Далее ДНК-мишени всех исследуемых генов получали разработанным методом мультиплексной ПЦР. Были протестированы различные варианты генов бета-лактамаз (TEM-1 и SHV-1), БЛРС класса А (TEM-3, TEM-6, SHV-2, SHV-5, CTX-M-3, CTX-M-9 и CTX-M-15) и карбапенемаз VIM-1, VIM-2, IMP-1, IMP-2, KPC-3, VIM-1,

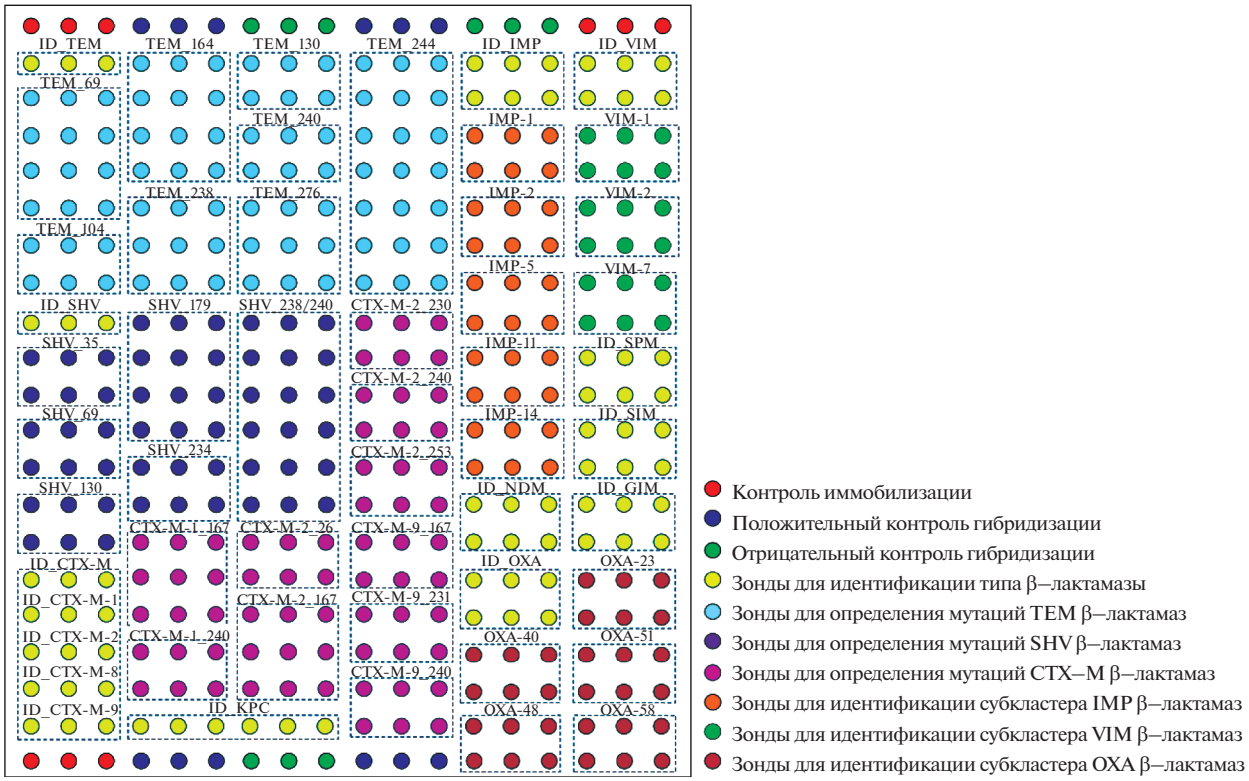


**Рис. 4.** Расположение олигонуклеотидных зондов на биочипе для идентификации генов 3 типов бета-лактамаз класса А, 8 – карбапенемаз и 24 позиций однонуклеотидного полиморфизма в генах

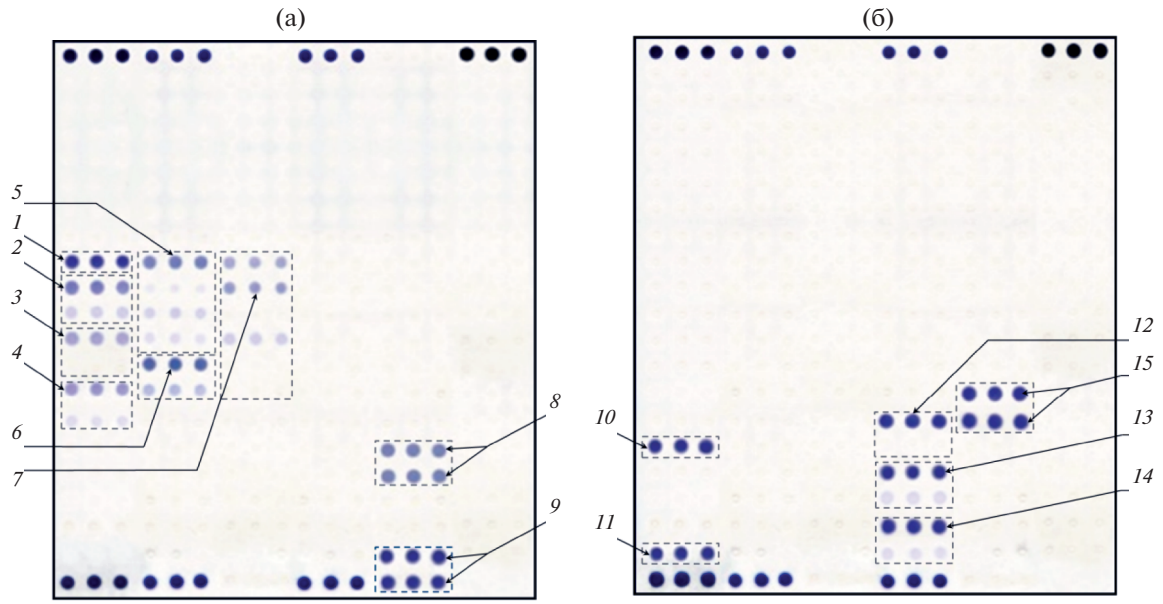


**Рис. 5.** Изображение биочипов после проведения гибридизационного анализа смесей ДНК, выделенных из контрольных штаммов грамотрицательных бактерий: а – смеси генов бета-лактамазы SHV-5 (окрашивание зон биочипа получено для зондов *1* (тип SHV) и зондов, определяющих аминокислотные мутации в SHV бета-лактамазах: *2* – Leu35, *3* – Met69, *4* – Ser130, *5* – Asp179, *6* – Lys234, *7* – замены Gly238Ser/Glu240Lys) и карбапенемазы OXA-48 (окрашивание зон биочипа получено для зондов *8* (тип OXA) и *9* (субкластер OXA-48)); б – смеси генов бета-лактамазы CTX-M-9, окрашивание зон биочипа получено для зондов *10* (тип CTX-M), *11* (субкластер CTX-M-9) и зондов, определяющих аминокислотные мутации в субкластере CTX-M-9: *12* – Pro167, *13* – Ala231, *14* – Asp240) и карбапенемазы NDM-1, окрашивание зон биочипа получено для зондов *15* (тип NDM).

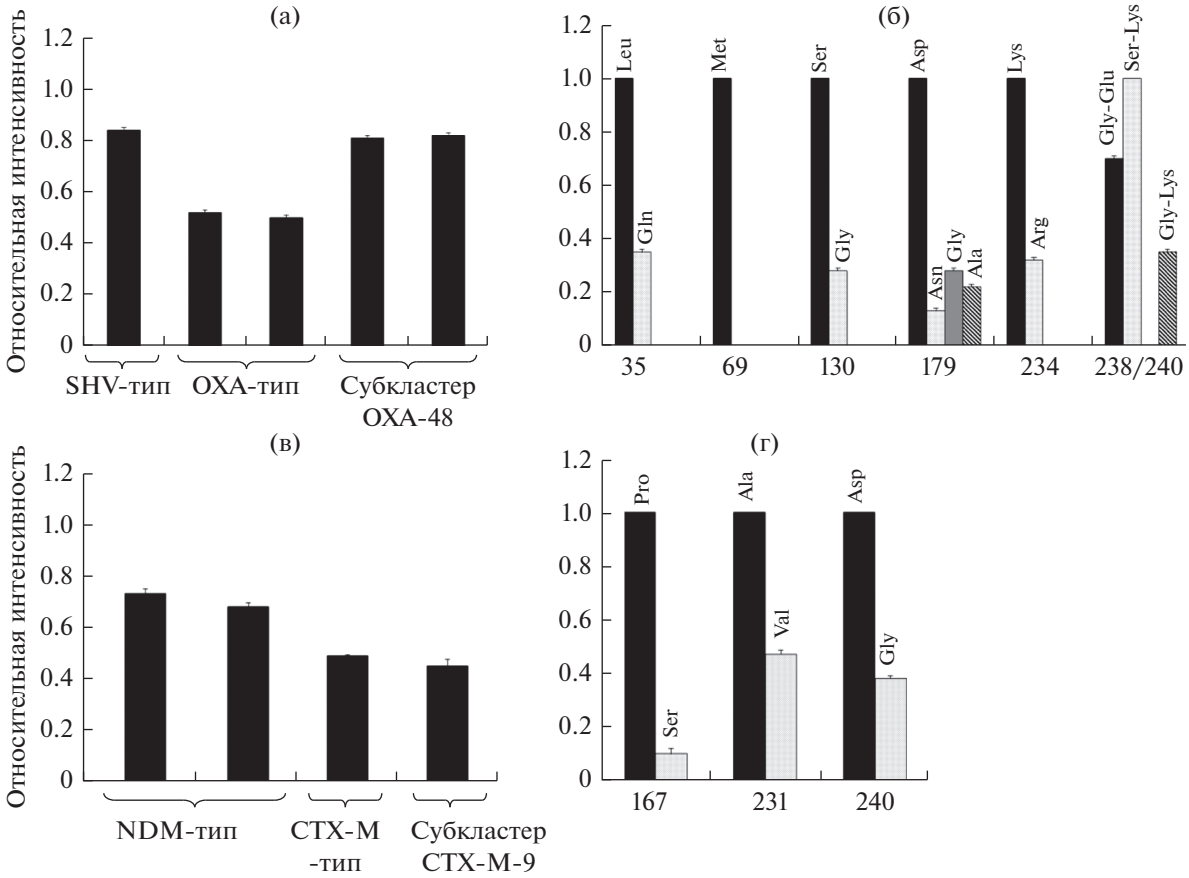


**Рис. 6.** Результаты гибридизационного анализа смесей ДНК, выделенных из контрольных штаммов грамотрицательных бактерий, на которых идентифицированы: а, б – смесь генов бета-лактамазы SHV-5 и карбапенемазы OXA-48: а – значимые сигналы гибридизации получены для зондов “тип SHV”, “тип OXA”, “субкластер OXA-48”; б – значимые сигналы гибридизации получены для зондов, определяющих следующие аминокислоты в ключевых позициях SHV бета-лактамаз: Leu35, Met69, Ser130, Asp179, Lys234, замены Gly238Ser/Glu240Lys (соответствует SHV БЛРС); в, г – смесь генов бета-лактамазы CTX-M-9 и карбапенемазы NDM-1: в – значимые сигналы гибридизации получены для зондов “тип NDM”, “тип CTX-M”, “субкластер CTX-M-9”, г – значимые сигналы гибридизации получены для зондов, определяющих следующие аминокислоты в ключевых позициях CTX-M бета-лактамаз: Pro167, Ala231, Asp240.

VIM-2, IMP-1, IMP-2, SPM-1, NDM-1, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-51 и OXA-58 в различных сочетаниях. Все ДНК-мишени гибридизовались как индивидуально, так и в комбинациях только со специфическими зондами, при этом уровень неспецифической гибридизации не превышал заданный интервал (5-кратное превышение стандартного отклонения усредненного значения аналитического сигнала). Во всех экспериментах наблюдали хороший уровень воспроизводимости интесивности окрашивания всех трех повторов каждого зонда. Коэффициенты вариации интенсивностей окрашивания зон всех специфических зондов с комплементарной ДНК-мишенью, каждый из которых был нанесен в трех повторах, варьировали от 5 до 10%. Для зондов, уровень гибридизации ДНК-мишени с которыми был незначительным и соответствовал неспецифической гибридизации, наблюдали более высокие значения коэффициентов вариации, но они не превышали 20%.

Результаты гибридизационного анализа представлены выборочно для двух смесей ДНК. Смесь № 1 была получена из образцов ДНК карбапенемазы OXA-48 и бета-лактамазы SHV-5, смесь № 2 состояла из ДНК металло-бета-лактамазы NDM-1 и бета-лактамазы CTX-M-9. Продукция таких сочетаний бета-лактамаз класса А и карбапенемаз описана у мультирезистентных клинических штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций [27]. На рис. 5 представлены изображения биочипов после проведения гибридизационного анализа двух смесей генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз, на рис. 6 – результаты количественной обработки интенсивностей окрашивания зон биочипа.

Поскольку все исследованные ДНК бета-лактамаз и карбапенемаз правильно и достоверно идентифицировались на биочипе, можно было

**Таблица 2.** Результаты гибридизационного анализа на биочипах образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных бактерий, на наличие генов бета-лактамаз и карбапенемаз

| Типы/Субтипы найденных бета-лактамаз и карбапенемаз | Число штаммов |
|---|---|
| Штаммы, чувствительные к цефалоспоринам 3–4 поколений и карбапенемам ($n$ = 19) | |
| Не обнаружено генов бета-лактамаз | 14 |
| TEM-1 | 2 |
| SHV-1 | 3 |
| Штаммы, устойчивые к цефалоспоринам 3–4 поколений ($n$ = 27) | |
| Продуцирующие одну БЛРС, в том числе на фоне пенициллиназ TEM-1 и/или SHV-1 ($n$ = 19) | |
| CTX-M-3 | 1 |
| CTX-M-15 | 1 |
| CTX-M-14 | 1 |
| TEM-1 + SHV-5 | 1 |
| TEM-1 + CTX-M-3 | 2 |
| TEM-1 + CTX-M-15 | 6 |
| TEM-1 + CTX-M-14 | 1 |
| SHV-1 + CTX-M-15 | 3 |
| TEM-1 + SHV-1 + CTX-M-15 | 3 |
| Продуцирующие две БЛРС, в том числе на фоне пенициллиназ TEM-1 и/или SHV-1 ($n$ = 8) | |
| SHV-5 + CTX-M-9 | 1 |
| TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-3 | 1 |
| TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-15 | 1 |
| TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-14 | 1 |
| SHV-1 + SHV-5 + CTX-M-14 | 1 |
| TEM-1 + SHV-1 + SHV-5 + CTX-M-15 | 2 |
| TEM-1 + SHV-1 + SHV-5 + CTX-M-14 | 1 |
| Штаммы, устойчивые к цефалоспоринам 3–4 поколений и карбапенемам ($n$ = 22) | |
| Продуцирующие одну карбапенемазу ($n$ = 12) | |
| VIM-2 | 11 |
| NDM | 1 |
| Продуцирующие две карбапенемазы ($n$ = 10) | |
| OXA-23 + OXA-51 | 1 |
| OXA-40 + OXA-51 | 5 |
| OXA-58 + OXA-51 | 4 |

заключить, что разработанный биочип позволял проводить высокоспецифическую идентификацию генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз с разделением отдельных типов ферментов на субкластеры даже при одновременной продукции нескольких ферментов в одном образце.

**Апробация биочипа для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А.** Разработанный олигонуклеотидный микрочип для определения генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А был апробирован на 68 образцах ДНК, выделенных из клинических штаммов *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, полученных в различных лечебных учреждениях России. Все штаммы были предварительно охарактеризованы фенотипически с использованием диско-диффузионного метода. Так, 19 образцов были чувствительны к действию цефалоспоринов 3–4 поколений и карбапенемов (отсутствие продукции БЛРС и карбапенемаз), 27 образцов оказались устойчивы к действию цефалоспоринов 3-4 поколений и характеризовались фенотипом БЛРС (+), а 22 образца – устойчивы к карбапенемам (карбапенемазы +).

Результаты гибридизационного анализа этих образцов на биочипах представлены в табл. 2. При тестировании 19 образцов ДНК, выделен-

ных из штаммов микроорганизмов, чувствительных к действию карбапенемов и цефалоспоринов 3–4 поколений, гены бета-лактамаз и карбапенемаз исследуемых типов не были обнаружены в 14, а среди 5 представителей *Enterobacteriaceae* spp. были идентифицированы гены пенициллиназ TEM-1 и SHV-1, которые обуславливали устойчивость к пенициллинам и цефалоспоринам I поколения. Таким образом, не было выявлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов наличия генов бета-лактамаз и карбапенемаз при тестировании на биочипах ДНК клинических образцов.

При исследовании 27 образцов ДНК бактерий, устойчивых к цефалоспоринам 3–4 поколений, в 19 были идентифицированы гены одной БЛРС (CTX-M типа ($n$ = 18) или SHV типа($n$ = 1)), в 8 – гены одновременно двух БЛРС (сочетания генов ферментов CTX-M и SHV типов). Ложноотрицательных результатов при тестировании клинических образцов не было выявлено.

При анализе 22 образцов ДНК бактерий, устойчивых к действию карбапенемов, в 12 образцах были идентифицированы гены одной карбапенемазы (типа VIM ($n$ = 11) или NDM ($n$ = 1)), а в 10 – гены одновременно двух карбапенемаз OXA типа.

Идентификация генов бета-лактамаз на микрочипах показала 100%-ное совпадение с данными микробиологического фенотипирования, секвенирования и метода ПЦР РВ. Разработанный биочип позволял правильно определить тип фермента, принадлежность к определенному субкластеру и наличие ключевых мутаций в ферментах класса А, определяющих профиль субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам.

Таким образом, оптимизация гибридизационного анализа на биочипах и пробоподготовки ДНК-мишени, проведенная методом мультиплексной ПЦР, позволила создать биочип, с помощью которого в одном анализе можно специфично идентифицировать гены всех клинически значимых на сегодняшний день бета-лактамаз. К его преимуществам можно отнести впервые выполненную на одном биочипе идентификацию генов нескольких типов ферментов на уровне субкластеров (четырех для бета-лактамаз CTX-M типа, пяти для карбапенемаз OXA типа, трех для карбапенемаз VIM типа, пяти для карбапенемаз IMP типа). Одновременно биочип позволял высокоспецифично определять ключевые замены в генах бета-лактамаз класса А, что важно для идентификации БЛРС. Общее время анализа образца ДНК составило около 4 ч. К одному из основных преимуществ разработанного метода относится высокая специфичность идентификации нескольких генов в одном образце, что может быть использовано при исследовании мультирезистентных штаммов бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00014-П).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cassini A., Högberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G.S.* // Lancet Infect Dis. 2019. V. 19. № 1. P. 56–66.
2. *Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S., Cohen J., Findlay D., Gyssens I., Heuer O.E., Kahlmeter G., Kruse H., Laxminarayan R., Liébana E., López-Cerero L., MacGowan A., Martins M., Rodríguez-Baño J., Rolain J.M., Segovia C., Sigauque B., Tacconelli E., Wellington E., Vila J.* // New Infections. 2015. V. 16. № C. P. 22–29.
3. *Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.* // Lancet. 2016. V. 387. № 10014. P. 176–187.
4. *Bush K.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2018. V. 62. № 10. P. 1–20.
5. *Bonomo RA.* // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2017. V. 7. № 1. P. 1–16.
6. *Bush K., Bradford P.A.* // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2016. V. 6. № 8. P. 1–22.
7. *van Duin D, Doi Y.* // Virulence. 2017. V. 8. № 4. P. 460–469.
8. *Naas T., Dortet L., Iorga B.I.* // Curr. Drug. Targets. 2016. V. 17. № 9. P. 1006–1028.
9. *Jean S.-S., Lee W.-S., Lam C., Hsu C.-W., Chen R.-J., Hsueh P.-R.* // Future Microbiol. 2015. V. 10. № 3. P. 407–425.
10. *Somboro A.M., Osei S.J., Amoako D.G, Essack S.Y., Bester L.A.* // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. V. 7. № 18. pii: e00698-18.
11. *Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z.* // Clin. Microbiol. Rev. 2019. V. 32. № 2. pii: e00115-18.
12. *Eichenberger E.M., Thaden J.T.* //Antibiotics (Basel). 2019. V. 8. № 2. P. pii: E37.
13. *Groundwater P.W., Xu S., Lai F., Varadi L., Tan J. Perry J.D., Hibbs D.E.* // Future Med. Chem. 2016. V. 8. № 9. P. 993–1012.
14. *Evans B.A., Amyes S.G.* // Clin. Microbiol. Rev. 2014. V. 27. № 2. P. 241–263.
15. *Geisinger E., Isberg R.R.* // J. Infect. Dis. 2017. V. 215. № S1. P. S9–S17.
16. *Hammoudi D., Moubareck C.A., Moubareck D.* // J. Microbiol. Methods. 2014. V. 107. P. 106–118.
17. *Fleece M.E., Pholwat S., Mathers A.J., Houpt E.R.* // Expert Rev. Mol. Diagn. 2018. V. 18. № 3. P. 207–217.
18. *Sekyere J.O., Govinden U., Essack S. Y.* // J. Appl. Microbiol. 2015. V. 119. № 5. P. 1219–1233.
19. *Murugan N., Malathi J., Therese K.L., Narahari H., Madhavan R.* // Kaohsiung J. Med. Sci. 2018. V. 34. № 2. P. 79e88.
20. *Lowman W., Marais M., Ahmed K., Marcus L.* // J. Hosp. Infect. 2014. V. 88. № 2. P. 66–71.

21. *Ledeboer N.A., Hodinka R.L.* // J. Clin. Microbiol. 2011. V. 9. Suppl. P. S20–S24.

22. *Moore N.M., Canton R., Carretto E., Peterson L.R., Sautter R.L., Traczewski M.M., Carba-R Study Team* // J. Clin. Microbiol. 2017. V. 55. № 7. P. 2268–2275.

23. *Ledeboer N.A., Lopansri B.K., Dhiman N., Cavagnolo R., Carroll K.C., Granato P., Thomson R.Jr., Butler-Wu S.M., Berger H., Samuel L., Pancholi P., Swyers L., Hansen G.T., Tran N.K., Polage C.R., Thomson K.S., Hanson N.D., Winegar R., Buchan B.W.* // J. Clin. Microbiol. 2015. V. 53. № 8. P. 2460–2472.

24. *Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M.* // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 26. № 4. P. 1252–1260.

25. *Ulyashova M.M., Khalilova Yu.I., Rubtsova M.Yu., Edelstein M.V., Alexandrova I.M., Egorov A.M.* //Acta Naturae. 2010. V. 2. № 3. P. 101–109.

26. *Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С.* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16. № 4. С. 254–265.

27. *Bush K.* // J. Glob. Antimicrob. Resist. 2013. V. 1. № 1. P. 7–16.

# Biochip For Simultaneous Identification of Beta-Lactamase and Carbapenemase Genes Conferring the Bacterial Resistance to Beta-Lactam Antibiotics

**M. Yu. Rubtsova[a], *, M. M. Ulyashova[a], Yu. I. Pobolelova[a], G. V. Presnova[a], and A. M. Egorov[a]**

[a]*Chemistry Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: mrubtsova@gmail.com*

Received September 5, 2019; revised October 15, 2019; accepted November 1, 2019

Bacterial beta-lactamases and carbapenemases confer the resistance to beta-lactam antibiotics, including penicillins, cephalosporins, carbapenems and monobactams. Their wide distribution among bacteria that cause infectious diseases in humans and animals represent a global threat. We have developed a biochip with colorimetric detection based on horseradish peroxidase for the simultaneous identification of genes for all clinically relevant class A beta-lactamases and carbapenemases of classes A, B and D, including 24 single substitutions in the nucleotide sequence, encoding the key amino acid substitutions in class A beta-lactamases. The conditions for allele-specific hybridization of biotin-labeled target DNA with oligonucleotide probes immobilized on the surface of the biochip have been optimized. To obtain the target DNA, a method of multiplex amplification of all studied genes in one reaction with the simultaneous incorporation of biotin was developed. The biochip was validated using mixtures of beta-lactamase and carbapenemase genes, as well as 68 DNA samples isolated from clinical strains of Gram-negative bacteria. The high specificity of the identification of genes in mixtures was demonstrated, which can be used in investigation of multiresistant bacteria.

*Keywords:* biochip, beta-lactamases, carbapenemases, DNA hybridization analysis, multiplex PCR, peroxidase, colorimetric detection

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 135–140

УДК 577.15

# ДЕЙСТВИЕ $Hg^{2+}$ НА HydSL ГИДРОГЕНАЗУ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Thiocapsa roseopersicina* BBS

**© 2020 г. Н. А. Зорин[1], *, А. С. Стародубов[1], А. А. Цыганков[1]**

[1]*Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, Московской обл., 142290 Россия*

**e-mail: zorin-na@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.07.2019 г.
После доработки 20.09.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Изучено ингибирующее действие хлорида ртути (II) на активность и структуру гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* BBS (HydSL). Определена кинетика ее инактивации в присутствии различных концентраций ингибитора. Установлен необратимый характер действия $Hg^{2+}$ и определены константы ингибирования гидрогеназы при разных температурах. Присутствие этого ингибитора в растворе фермента значительно снижало его стабильность и вызывало денатурацию при температуре выше 50°C. В течение процесса инкубации фермента с $Hg^{2+}$ происходило обесцвечивание полосы поглощения в видимой области спектра, что указывало на разрушение железосерных кластеров. Сравнительный анализ ИК-Фурье-спектров гидрогеназы без добавления ингибитора и после инкубации с ним свидетельствовал о разрушении NiFe-активного центра.

*Ключевые слова:* хлорид ртути (II), водород, гидрогеназа, инфракрасные спектры, NiFe-активный центр, железосерные кластеры

**DOI:** 10.31857/S0555109920020154

Гидрогеназа относится к металлоферментам и катализирует обратимую реакцию восстановления протонов до молекулярного водорода.

$$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2.$$

Более трех десятков гидрогеназ получено в гомогенном состоянии из микроорганизмов разных таксономических групп, для части из них установлена трехмерная кристаллическая структура [1, 2]. По содержанию металлов в активном центре различают три типа гидрогеназ [1]. 1. [NiFe]-гидрогеназы содержат биметаллический железоникелевый активный центр и являются в своем большинстве гетеродимерами. 2. [FeFe]-гидрогеназы содержат двухатомный кластер железа в активном центре. 3. Fe-гидрогеназы не содержат металлов, но включают Fe-содержащий кофактор. Для изученных [NiFe]-гидрогеназ показано, что биметаллический кластер активного центра ковалентно связан с белком четырьмя остатками цистеина, два из которых образуют связывающий мостик между ионами Ni и Fe, а два других координируют ион Ni. В зависимости от редокс-состояния фермента между ионами металлов может присутствовать небелковый лиганд. Атом железа в составе кластера связан с тремя небелковыми двухатомными лигандами, один из которых является CO лигандом и два – $CN^-$ лигандами [3].

Термостабильная HydSL-гидрогеназа из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS относится к [NiFe]-гидрогеназам и состоит из двух субъединиц с молекулярными массами 64 и 34 кДа. Биметаллический активный центр глубоко погружен в большой субъединице, а малая субъединица содержит три железосерных кластера, которые образуют транспортную систему для внутримолекулярного переноса электронов между активным центром и поверхностью фермента [4, 5]. В межмолекулярном переносе электронов от гидрогеназы к акцептору важную роль играют электростатические взаимодействия между ферментом и субстратом [6]. Показано, что в составе активного центра гидрогеназы *T. roseopersicina* также содержатся двухатомные CO и $CN^-$ лиганды [7].

Необходимость изучения действия тяжелых металлов на гидрогеназы обусловлена двумя причинами. Во-первых, метаболизм водорода у пурпурной несерной бактерии *T. roseopersicina* играет важную роль при росте как в фототрофных анаэробных, так и хемогетеротрофных микроаэробных условиях. Следует отметить, что эта

бактерия содержит не менее 5 гидрогеназ, кодируемых разными генами. При этом 4 из них являются функционально активными, синтезируются в различных условиях и участвуют в поглощении и выделении водорода [8, 9]. Таким образом, действие тяжелых металлов на гидрогеназу может существенно нарушать метаболизм водорода у *T. roseopersicina*. Во-вторых, иммобилизованная на электроде HydSL-гидрогеназа *T. roseopersicina* является перспективным водород-активирующим катализатором для разработки новых типов топливных элементов и водородных сенсоров на основе прямого биоэлектрокатализа [10, 11]. В связи с этим в практическом плане важно понимать механизм действия тяжелых металлов на HydSL гидрогеназу.

Действие ртути на [NiFe] гидрогеназу из *T. roseopersicina* [12], *Desulfovibrio gigas* [13] и *D. vulgaris* [14] было изучено ранее. Во всех работах показано, что ионы ртути необратимо ингибировали гидрогеназную активность. Отмечено также, что при действии ртути у всех гидрогеназ происходило разрушение железосерных кластеров, хотя количественные показатели различались. Действие ртути на активный центр гидрогеназ не изучалось. В связи с этим необходимо установить связана ли необратимая потеря активности гидрогеназы, наблюдаемая при длительной инкубации фермента с $Hg^{2+}$, с разрушением FeS-кластеров, а не NiFe-активного центра фермента.

Цель работы – оценить количественно влияние хлорида ртути(II) на HydSL-гидрогеназу из *T. roseopersicina* в широких временном и концентрационном диапазонах.

## МЕТОДИКА

Клетки пурпурной серной бактерии *T. roseopersicina* BBS выращивали в анаэробных фотогетеротрофных условиях на модифицированной среде Пфеннига [15] в присутствии 0.2%-ного ацетата натрия при освещении лампами накаливания (30–50 Вт $м^{-2}$) и 28°C.

В работе использовали метилвиологен и реактивы для электрофореза в ПААГ (“Sigma”, Германия), фенилсефарозу CL-4B (“Pharmacia”, Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу $DE_{52}$ (“Whatman”, Англия), и дитионит натрия (“Fluka”, Швейцария). Остальные реактивы – отечественного производства марок х. ч. и ос. ч.

**Получение экстрактов клеток и очистка гидрогеназы.** Клетки отделяли от культуральной жидкости в конце экспоненциальной фазы роста и ресуспендировали (200 г) в 20 мМ K-фосфатном буфере, pH 7.0, в соотношении 1 : 1. Затем клетки разрушали обработкой 80%-ным ацетоном и ультразвуком на дезинтеграторе УЗГТ-01/22 22 кГц, 3 раза по 10 мин при 10°C, как описано ранее [12]. Из экстрактов клеток гидрогеназу фракционировали сульфатом аммония и последовательно подвергали жидкостной хроматографии на фенилсефарозе CL-4B и ДЭАЭ-целлюлозе $DE_{52}$ [16]. Окончательную стадию очистки фермента осуществляли с использованием препаративного электрофореза в 7%-ном ПААГ, как описано ранее [17].

**Влияние хлорида ртути (II) на активность гидрогеназы.** Действие хлорида ртути (II) определяли в широком диапазоне концентраций ингибитора и фермента. Использовали свежеприготовленный запасной раствор 0.1 М $HgCl_2$ в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.0. Константу скорости реакции инактивации определяли графическим методом [18].

**Определение гидрогеназной активности.** Активность гидрогеназы определяли спектрофотометрическим методом по реакции восстановления окисленного метилвиологена водородом в кювете Тунберга [12]. Реакционная смесь (общий объем 2 мл) содержала 50 мМ трис-HCl буфер, pH 9.0, 4 мМ метилвиологена и 1–10 мкг гидрогеназы. Кювету заполняли водородом, а для инициирования реакции при необходимости добавляли следовые количества (5–10 мкл) 20 мМ раствора дитионита натрия, приготовленного в анаэробных условиях. Все измерения активности фермента проводили при 30°C. Для расчета использовали коэффициент поглощения восстановленного метилвиологена ($\varepsilon_{600}$ = 13.00 $мМ^{-1} \cdot см^{-1}$). Ферментативную активность выражали в мкмоль $H_2$/мин на 1 мг белка. Активность гидрогеназы по реакции изотопного обмена водорода в системе $H_2/D_2O$ регистрировали по образованию HD на изотопном масс-спектрометре Delta V Advantage (“Thermo Fisher”, Германия).

**Регистрация и обработка спектров.** ИК-Фурье спектры гидрогеназы регистрировали на спектрофотометре Nicolet 6700 (“Bruker”, Германия) в стандартной жидкостной кювете с окнами из фторида кальция. Растворы гидрогеназы концентрировали до примерно 1 мМ концентрации (около 100 мг/мл) с использованием микроконцентраторов “Microcon-10” (“Amicon”, США). Полученный концентрированный раствор в 10 мМ K-фосфатном буфере, pH 7.0, объемом 10 мкл наносили на окно из $CaF_2$. На него помещали спейсер 50 мкм, сверху второе окно из $CaF_2$ и собирали ячейку. ИК спектры регистрировали в диапазоне 4000–1000 $см^{-1}$ с детектором МСТ (“Visinic”, Израиль) с разрешением 2 $см^{-1}$ при комнатной температуре.

Для получения ИК-спектров с Фурье преобразованием первоначально измеряли 128 сканов базовой линии на воздухе с пустым кюветным отделением, затем записывали 128 сканов контроля (фосфатный буфер) или гидрогеназы в буфере. Измерения повторяли 2 раза, усредняли 2 спектра и получали спектр поглощения. Из ИК-спектра

поглощения гидрогеназы вычитали ИК-спектр поглощения буфера, нормированный в максимуме полосы поглощения воды при ~2130 нм. Искажения базовой линии в полученном спектре корректировали в ручном режиме в программе Origin.

Спектры поглощения растворов гидрогеназы в области 350–600 нм измеряли на спектрофотометре “Shimadzu 1600” (“Shimadzu”, Япония). Концентрацию фермента определяли по поглощению при 400 нм с использованием для расчета коэффициента экстинкции: ($\varepsilon_{400}$ = 42 мМ$^{-1}$ · см$^{-1}$).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инактивирующее действие хлорида ртути на гидрогеназы проявлялось при всех изученных его концентрациях (рис. 1а). В присутствии 5 мМ $HgCl_2$ степень ингибирования фермента достигала 90% в течение 2 ч. При уменьшении концентрации ингибитора кинетика инактивации была более медленной (рис. 1а).

При значительном снижении концентрации ингибитора путем разбавления реакционной среды в 1000 раз восстановления активности фермента не наблюдалось, т.е. степень ингибирования не изменялась. Практически полное удаление $HgCl_2$ при трехкратной промывке гидрогеназы на микроконцентраторах “Microcon10” (“Electro Terminal”, Германия, удаление соединений с массой <10 кДа) также не приводило к восстановлению активности фермента, что указывало на необратимый характер ингибирования.

Для определения количественных параметров ингибирования гидрогеназы $HgCl_2$ измеряли кинетику его действия при 20 и 50°C. Взаимодействие гидрогеназы с этим ингибитором является необратимой бимолекулярной реакцией, которая характеризуется константой скорости реакции второго порядка $k_{II}$. Кинетические кривые инактивации (рис. 1а, 1б) описываются уравнением первого порядка с кажущейся константой скорости реакции первого порядка $k_I$, которая является функцией концентрации $HgCl_2$. По тангенсу угла наклона линейной зависимости $k_I$ от концентрации $HgCl_2$ (рис. 1в) определяли константу скорости реакции второго порядка, величина которой составляла 3.95 ± 0.41 М$^{-1}$ · мин$^{-1}$ при 20°C (рис. 1в) и увеличивалась до 17.5 ± 1.4 М$^{-1}$ · мин$^{-1}$ при 50°C (данные не приведены).

Как было показано ранее, HydSL-гидрогеназа из пурпурной бактерии *T. roseopersicina* BBS характеризовалась высокой термостабильностью, и ее инактивация наблюдалась при температуре выше 70°C [19]. Однако в присутствии 1 мМ $HgCl_2$ стабильность этого фермента значительно снижалась. Так, при нагревании гидрогеназы в присутствии ингибитора в течение 10 мин происходила

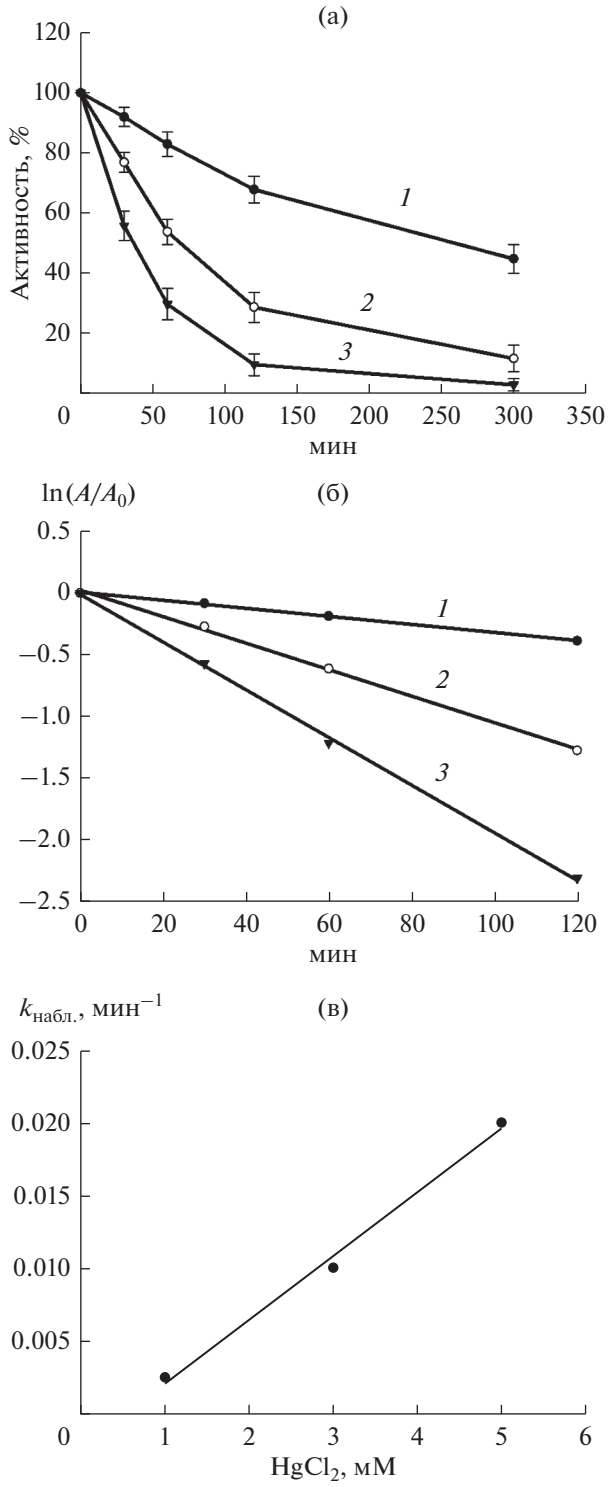


**Рис. 1.** Кинетика инактивации HydSL-гидрогеназы *T. roseopersicina* в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.0, в присутствии 1 (*1*), 3 (*2*) и 5 мМ (*3*) $HgCl_2$ при 20°C (а): б – линериаризация данных в полулогарифмических координатах; в – зависимость наблюдаемой константы скорости реакции инактивации первого порядка от концентрации $HgCl_2$ (константа скорости необратимого взаимодействия $HgCl_2$ с ферментом равна 3.95 ± 0.41 М$^{-1}$ · мин$^{-1}$).

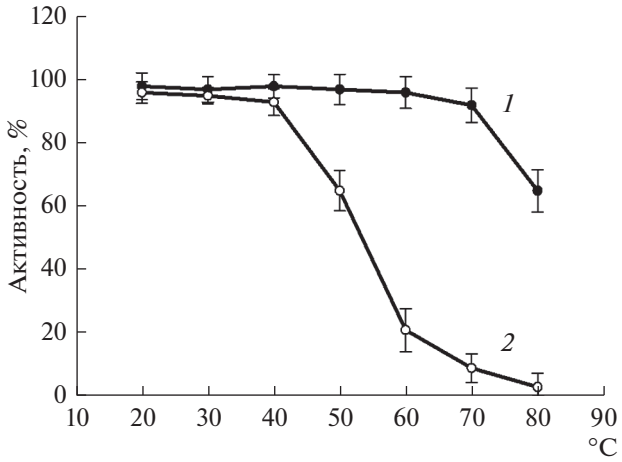


**Рис. 2.** Инактивация гидрогеназы (1 мг/мл) без добавления (*1*) и в присутствии 1 мМ $HgCl_2$ (*2*) после нагревания при заданной температуре в течение 10 мин.

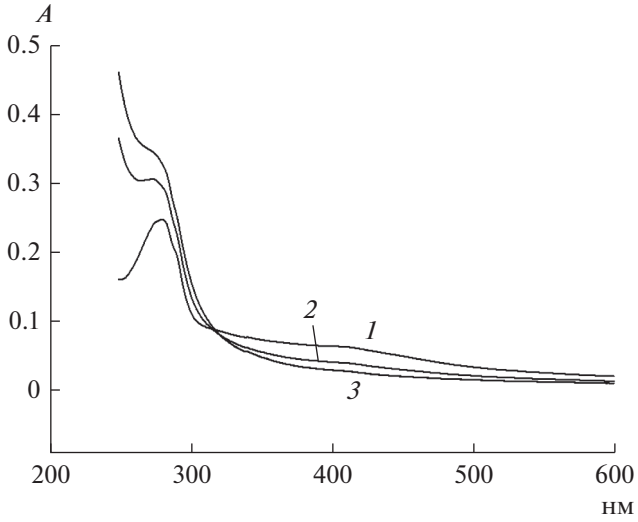


**Рис. 3.** Спектры нативной гидрогеназы с концентрацией 2.4 мг/мл (*1*) и после инкубации с 1 мМ $HgCl_2$ в течение 1 (*2*) и 5 ч (*3*) при 20°C.

значительная инактивация уже при 50°C (рис. 2). При более длительном (>60 мин) нагревании при этой температуре происходила полная инактивация, фермент полностью терял активность, что указывало на совместный эффект инактивирующего действия нагревания и $HgCl_2$.

Железосерные кластеры в составе гидрогеназы обладают характерным поглощением в области 410 нм [12]. После длительной инкубации гидрогеназы с $Hg^{2+}$ наблюдалось практически полное обесцвечивание этой полосы поглощения (рис. 3), что свидетельствовало о разрушении железосерных кластеров в составе фермента. При этом скорость обесцвечивания этой полосы близка кинетике инактивации гидрогеназы в присутствии $Hg^{2+}$, что соответствовало полученным раннее данным о гидрогеназах из сульфатредуцирующих бактерий [13, 14].

ИК-Фурье-спектры гидрогеназы *T. roseopersicina* проявляли характерные полосы для двухатомных лигандов, изменение которых при действии ингибитора может характеризовать состояние активного центра. Для проверки влияния хлорида ртути (II) на активный центр 1 мМ гидрогеназы инкубировали с ингибитором в течение 20 ч, а затем измеряли остаточную активность и регистрировали ИК-Фурье-спектры (рис. 4). Степень ингибирования гидрогеназной активности ионами ртути достигала приблизительно 75%, т.е. остаточная активность составляла 25%. Амплитуда пиков двухатомных лигандов в ИК-спектре гидрогеназы уменьшалась в 3.5 раза для всех трех пиков, причем положение полос лигандов не изменялось. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о разрушении активного центра при ингибирующем действии $Hg^{2+}$ (рис. 4). Неполная инактивация гидрогеназы при использовании 10 мМ хлорида ртути (II) и его инкубации с ферментом в течение 20 ч выглядит противоречащей предыдущим результатам рис. 1а, показавшим, что 5 мМ хлорид ртути (II) инактивировал более 95% активности в течение 5 ч. Однако учитывая, что при записи спектров FTIR использовалась высокая концентрация гидрогеназы (около 1 мМ), можно предположить, что использованной концентрации ингибитора было недостаточно для полного взаимодействия с гидрогеназой.

На разрушение активного центра фермента при действии $Hg^{2+}$ указывало также и отсутствие способности инактивированной гидрогеназы катализировать реакцию изотопного обмена водорода в системе $H_2/D_2O$. Гидрогеназа проявляла высокую активность в реакции дейтериевого обмена без добавления ингибитора [20], а после взаимодействия с 1 мМ хлоридом ртути (II) в течение 24 ч активность фермента в реакции изотопного обмена водорода не обнаруживалась.

Ранее было показано, что гидрогеназа *T. roseopersicina* проявляла относительно высокую термостабильность и устойчивость к действию мочевины, детергентов, отдельных органических растворителей и протеолитических ферментов [19, 21, 22]. По устойчивости к таким каталитическим ядам как CO и $H_2S$, фермент превосходит платину, которая широко используется в качестве водородактивирующего катализатора в топливных элементах [8]. Определение пределов устойчивости гидрогеназы к действию ряда других денатурирующих факторов, в том числе влиянию тяжелых металлов необходимо для разработки новых

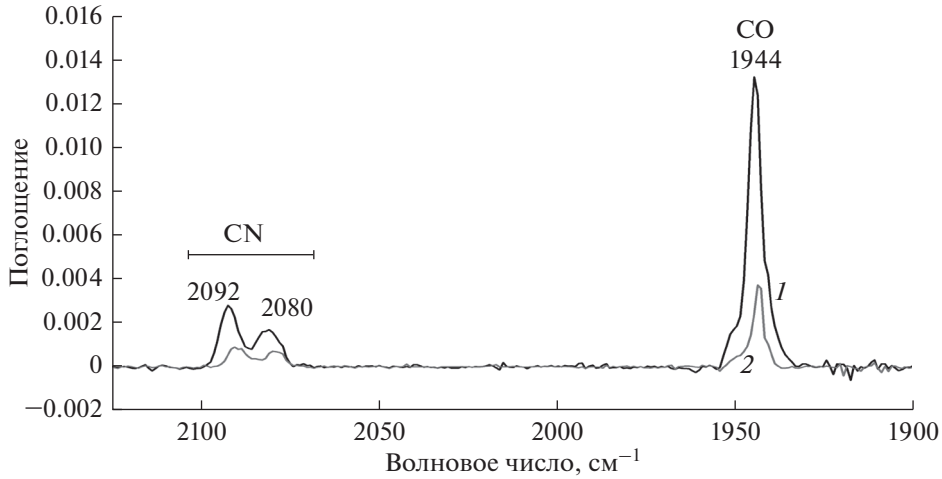


**Рис. 4.** ИК-Фурье-спектры нативной гидрогеназы (концентрация ~100 мг/мл, *1*) и после инкубации с 10 мМ $HgCl_2$ в течение 20 ч (*2*) при 20°С.

преобразователей энергии на основе этого активирующего водород фермента.

Химическая модификация отдельных функциональных групп гидрогеназы при действии различных ингибиторов позволит получить новую информацию о механизме ее каталитического действия. Газообразные ингибиторы (CO, $O_2$ и $C_2H_2$) обратимо взаимодействуют с активным центром, но не влияют на структуру фермента [23]. Взаимодействие цианида с гидрогеназой *T. roseopersicina* приводило к разрушению железосерных кластеров, но не влияло на структуру активного центра [7]. При длительной инкубации фермента с $Hg^{2+}$ разрушались как железосерные кластеры, так NiFe-активный центр. В тоже время структура и размер пептидов (большой и малой субъединиц) не изменялись при такой обработке, на что указывало совпадение положения белковых зон при электрофорезе в ПААГ с Na-ДДС нативной и обработанной $Hg^{2+}$ гидрогеназы (данные не приведены).

Таким образом, в данной работе показано, что ионы ртути (II) необратимо ингибировали HydSL гидрогеназу. При этом белковые субъединицы не разрушались, но деградировали железосерные кластеры и активный центр фермента.

Авторы выражают благодарность А.А. Забелину за содействие в регистрации и обработке ИК-Фурье-спектров гидрогеназы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vignais P., Billoud B.* // Chem. Rev. 2007. V. 107. № 10. P. 4206–4272.
2. *Yagi T., Higuchi Y.* // Proc. Japn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci. 2013. V. 89. № 1. P. 16–13.
3. *Shafaat H.S., Rudiger O., Ogata H., Lubitz W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1827. № 8–9. P. 986–1002.
4. *Гоготов И.Н., Задворный О.А., Зорин Н.А., Серебрякова Л.Т.* Фотосинтезирующие микроорганизмы / Ред. В.Ф. Гальченко. Труды Института микробиологии им. С.Н. Вернардского, № 15. М.: МАКС Пресс, 2010. С. 260–289.
5. *Абдуллатыпов А.В., Цыганков А.А.* // Компьютерные исследования и моделирование. 2013. Т. 5. № 4. С. 737–747.
6. *Абдуллатыпов А.В., Зорин Н.А., Цыганков А.А.* // Биохимия. 2014. Т. 79. № 8. Р. 1009–1014.
7. *Zorin N.A., Zabelin A.A., Shkuropatov A.Ya., Tsygankov A.A.* // J. Inorg. Biochem. 2017. V. 177. № 1. P. 190–197.
8. *Laurinavichene T.V., Rakhely G., Kovacs K.L., Tsygankov A.A.* // Arch. Microbiol. 2007. V. 188. № 4. P. 403–410.
9. *Rakhely G., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A., Kovacs K.L.* // Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics. 2007. V. 1767. № 6. P. 671–676.
10. *Karyakin A.A., Morozov S.V., Karyakina E.E., Zorin N.A., Perelygin V.V., Cosnier S.* // Biochem. Soc. Trans. 2005. V. 33. № 1. P. 73–75.
11. *Воронин О.Г., Конищева Е.В., Зорин Н.А., Федотенков Ф.А., Карякина Е.Е., Карпачева Г.П., Орлов А.В., Киселева С.Г., Карякин А.А.* // Нано- и микросистемная техника. 2013. Т. 5. № 1. С. 15–19.
12. *Задворный О.А., Зорин Н.А., Гоготов И.Н.* // Биохимия. 2000. Т. 65. № 11. С. 1525–1529.
13. *Fernandez V.M., Rua M.L., Reyrs P., Cammack R., Hatchikian E.C.* // Eur. J. Biochem. 1989. V. 185. № 3. P. 449–454.
14. *Kamachi T., Uno S., Hiraishi T., Okura I.* // J. Mol. Catal. A: Chemical. 1995. V. 96. № 3. P. 329–333.
15. *Богоров Л.А.* // Микробиология. 1974. Т.43. № 2. С. 326–333.

16. *Шерман М.Б., Орлова Е.В., Зорин Н.А., Смирнова Е.А., Куранова И.П., Гоготов И.Н.* // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 8. С. 509–512.

17. *Gogotov I.N., Zorin N.A., Serebriakova L.T., Kondratieva E.N.* // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 523. № 2. P. 335–343.

18. *Варфоломеев С.В., Гуревич К.Г.* Биокинетика: Практический курс. / Ред. М.А. Островский, Г.Б. Сергеев. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1998. 720 с.

19. *Зорин Н.А., Гоготов И.Н.* // Биохимия. 1982. Т. 47. № 5. С. 827–833.

20. *Zorin N.A., Dimon B., Gagnon J., Gaillard J., Carrier P., Vignais P.V.* // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. № 4. P. 675–681.

21. *Serebryakova L.T., Zorin N.A., Karyakin A.A.* // Enzyme Microb. Technol. 2009. V. 44. № 3. P. 329–333.

22. *Kovacs K.L., Bagyinka Cs., Tigy G.* // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 935. № 2. P. 166–172.

23. *Zorin N.A.* // Biochimie. 1986. V. 68. № 1. P. 97–101.

# The Effect $Hg^{2+}$ on HydSL Hydrogenase of Purple Sulfur Bacteria *Thiocapsa roseopersicina* BBS

**N. A. Zorin[a], *, A. S. Starodubov[a], and A. A. Tsygankov[a]**

[a] *The Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Separate division of the Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Center "Pushchino Research Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

**e-mail: zorin-na@mail.ru*

Received July 10, 2019; revised September 20, 2019; accepted November 1, 2019

The inhibitory effect of mercury chloride (II) on the activity and structure of hydrogenase *Thiocapsa roseopersicina* BBS was studied. The kinetics of hydrogenase inactivation in the presence of different inhibitor concentrations was determined. Irreversible nature of $Hg^{2+}$ action was established and hydrogenase inhibition constants at different temperatures were determined. The presence of this inhibitor in the enzyme solution significantly reduced its stability and caused denaturation at temperatures above 50°C. In the process of incubation of the enzyme with $Hg^{2+}$, the absorption band fades in the visible region of the spectrum, indicating the destruction of iron-sulfur clusters. Comparative analysis of IR-Fourier spectra of hydrogenase without addition and after incubation with inhibitor indicates the destruction of the NiFe – active center.

*Keywords:* mercury chloride (II), hydrogen, hydrogenase, infrared spectra, NiFe – active center, iron-sulfur clusters

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 141–146

УДК 577.152.4

# ВЫДЕЛЕНИЕ В ГОМОГЕННОМ СОСТОЯНИИ КОНСТИТУТИВНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЩИТКОВ КУКУРУЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ХАРАКТЕРИСТИК

**© 2020 г. А. Т. Епринцев[1], *, Д. Н. Федорин[1]**

[1]*"Воронежский государственный университет", Воронеж, 394018 Россия*

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

Поступила в редакцию 02.09.2019 г.
После доработки 30.09.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Применение модифицированной 4-стадийной схемы очистки позволило получить электрофоретически гомогенные препараты конститутивных форм сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы на поздних стадиях прорастания. Установлено, что изоферменты значительно отличались четвертичной структурой. Так, сукцинатдегидрогеназа 1 оказалась гетеротетрамером, а сукцинатдегидрогеназа 2 – гетеродимером. Обнаружено, что их основные каталитические и кинетические характеристики также различались, в частности, их сродство к субстрату (сукцинат) и значение pH-оптимума катализируемой реакции. Сукцинатдегидрогеназа 2 отличалась повышенной устойчивостью к специфическому ингибитору, малонату.

*Ключевые слова:* изоформы, сукцинатдегидрогеназа, ДЭАЭ-целлюлоза, субъединица, константа Михаэлиса, pH-оптимум, ингибирование

**DOI:** 10.31857/S0555109920020063

Сукцинат:убихинон оксидоредуктаза (сукцинатдегидрогеназа, **СДГ**, КФ 1.3.5.1) представляет собой ферментный комплекс внутренней мембраны митохондрий, обеспечивающий функционирование электрон-транспортной цепи (**ЭТЦ**). СДГ принимает также участие в работе цикла Кребса, окисляя сукцинат с запасанием энергии в виде ФАДН. Обсуждается роль СДГ-системы в обеспечении других биосинтетических процессов клетки, в частности, глюконеогенеза, где она участвует в утилизации сукцината, образующегося в результате работы глиоксилатного цикла [1, 2]. Формирование набора изоферментов СДГ, участвующих в различных метаболических процессах клетки, обусловлено генетическим полиморфизмом этой ферментной системы, характерной для растений. Так, модельное растение *Arabidopsis thaliana* L. содержит в ядерном геноме 8 генов, кодирующих СДГ-систему [3]. Аналогичная ситуация характерна и для С4-растения кукурузы, в ядерном геноме которого также обнаружено 8 генов, кодирующих субъединицы СДГ [4].

Наличие в растениях значительного генетического полиморфизма СДГ позволяет клетке, с одной стороны, формировать набор изоферментов для обеспечения ее нормального функционирования, а, с другой – адаптироваться к стрессовым факторам. Ранее у кукурузы и арабидопсиса было обнаружено наличие на разных этапах развития растения нескольких молекулярных форм СДГ. Так, при прорастании семян в щитках кукурузы обнаруживаются 4 изофермента с различной электрофоретической подвижностью, различающиеся по кинетическим характеристикам [5]. Однако на всех этапах прорастания присутствуют две постоянные изоформы фермента, которые принято обозначать как конститутивные [5, 6]. Сходные данные были получены и для модельного объекта арабидопсиса, в семенах которого при прорастании также обнаружено 4 формы СДГ [7, 8]. Для определения их функциональной роли необходимо изучить их физико-химические и каталитические характеристики.

Установлено, что формирование изозимного полиморфизма обусловлено дифференциальной экспрессией генов, кодирующих СДГ-комплекс [6, 9]. В частности, гены его каталитического димера имеют сходную структуру и кодируют гомологичные белки, однако показана их дифференциальная экспрессия на разных этапах прорастания семян кукурузы и арабидопсиса [6, 8, 10].

Координация метаболических процессов при прорастании семян и переходе к фотосинтезу является основным механизмом регуляции клеточного метаболизма. Ферментные системы, в том числе СДГ, играют значительную роль в процессе

зеленения проростков при изменении типа питания с гетеротрофного на автотрофный [11].

В связи с этим особый интерес представляет процесс прорастания жирозапасающих семян, в которых активно идет липолиз и последующий глюконеогенез из жирных кислот. Особый тип метаболизма был описан для щитка кукурузы, в котором помимо мобилизации запасных липидов происходит ацидификация эндосперма за счет экскреции органических кислот из щитка, что приводит к активации гидролаз и ускорению гидролиза запасных питательных веществ [12]. Ранее было показано, что в зависимости от степени масличности семян кукурузы и активности глиоксилатного цикла меняется изоферментный состав другого фермента цикла трикарбоновых кислот (**ЦТК**) – малатдегидрогеназы [13].

Получение препаратов СДГ на разных этапах развития семян и сравнительная характеристика их свойств откроет перспективы для изучения ее функциональной значимости в организации клеточного метаболизма. Изучение структуры и свойств изоферментов СДГ на поздних стадиях развития семян позволит установить их роль в организации метаболизма щитков при трансформации клеточного метаболизма с гетеротрофного типа питания на автотрофный.

Цель работы – выделение конститутивных изоферментов СДГ из щитков кукурузы на завершающей стадии прорастания и изучение их физико-химических и кинетических характеристик.

## МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовали щитки 8-суточных прорастающих семян кукурузы (*Zea mays* L.) сорта “Воронежская 76”, выращенных гидропонным методом при 12-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Дж/(м$^2$ с) при 20°С.

Активность фермента определяли на T70+ UV-VIS спектрофотометре (“PG Instruments Limited”, Великобритания) спектрофотометрическим методом, основанном на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [8]. Содержание белка в пробе определили по методу Лоури [14].

Для разделения изоферментов СДГ использовали схему очистки, включающую несколько стадий. Гомогенат получали из 2 г растительного материала, который гомогенизировали в соотношении 1 : 10 в среде для выделения, содержащей 50 мМ Трис-HCl-буфер, pH 7.5, и 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ KCl и 4 мМ $MgCl_2$. Белки осаждали фракционированием сульфатом аммония 20–60% насыщения, осадок ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.8. Полученные ферментные фракции наносили на колонку (1.5 × 20 см) с сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция) для освобождения от низкомолекулярных примесей. Объем наносимого раствора не превышал 3 мл. Белки элюировали 10 мМ фосфатным буфером, pH 7.8, содержащим 20 мМ сукцинат натрия, со скоростью 15–20 мл/ч. Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1.5 × 12 см) с ДЭАЭ-целлюлозой (“Whatman”, Великобритания), уравновешенной 30 мМ фосфатным буфером, pH 7.8, содержащим 30 мМ KCl. Фермент десорбировали линейным градиентом концентрации KCl в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.8, содержащем 20 мМ сукцинат. Во фракциях (2 мл) определяли активность изоферментов СДГ.

Свойства изоферментов СДГ изучали, используя электрофоретически гомогенные препараты.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7.5%-ном полиакриламидном геле [15]. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью $AgNO_3$ [16], для специфической идентификации СДГ использовали тетразолиевый метод и 0.1 М калий-фосфатный буфер, pH 7.5, содержащий 0.1 М сукцинат натрия, 0.5 мг/мл нитросинего тетразолия и 1 мг/мл феназин метасульфата.

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони) [17]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при $p < 0.05$).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На начальных этапах прорастания семена осуществляют гетеротрофный тип питания, используя в качестве субстратов запасные вещества [9]. Значительное увеличение активности СДГ в первые сутки онтогенеза, вероятно, связано с необходимостью метаболизации дополнительного сукцината, образующегося в глиоксилатном цикле [18]. Снижение интенсивности функционирования СДГ после 4 сут прорастания происходит в результате перехода развивающегося растительного организма на автотрофный тип питания. В этом случае уменьшается интенсивность функционирования глиоксилатного цикла, приводя к снижению активности СДГ [7, 9].

В щитках кукурузы на 8 сут прорастания электрофоретическим анализом в полиакриламидном геле было обнаружено присутствие двух изоферментов СДГ с $R_f$ 0.29 и 0.33 (рис. 1).

Предыдущее изучение изоферментного состава СДГ позволило выявить индуцибельные и конститутивные формы фермента в щитках кукурузы. Так, оказалось, что изоферменты СДГ, мигрирующие в геле с $R_f = 0.29$ и 0.33, являются конститутивными, поскольку эти формы проявлялись в течение всего периода прорастания семян кукурузы [7]. Можно предположить, что они являются компонентами цикла Кребса и ЭТЦ митохондрий, принимающими участие в окислительном метаболизме при гетеротрофном типе питания. Ранее об интенсификации ЦТК на этом этапе развития кукурузы сообщалось в других работах [19, 20].

Можно предположить, что, начиная с 8 сут прорастания, процессы фотосинтеза становились достаточно активными и растение перешло к автотрофному типу питания, в то время как в щитках оставались активными две конститутивные изоформы СДГ, свойства и условия работы которых отличались от тех, в которых они функционировали при переходе к автотрофному типу питания (рис. 1).

Для получения электрофоретически гомогенных препаратов изучаемого фермента щитков кукурузы была проведена 4-стадийная очистка, результаты которой представлены в табл. 1. После десорбции изоферментов с ДЭАЭ-целлюлозы линейным градиентом концентрации KCl (50–250 мМ) были получены два препарата, обладающие сукцинатдегидрогеназной активностью. Удельная активность для первого изофермента (**СДГ1**) равнялась 1.130 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 61.86 раз и выход – 9.44%. Для второго изофермента (**СДГ2**) значение удельной активности было 0.833 Е/мг белка, а степень очистки и выход – 45.61 раз и 5.07% соответственно (табл. 1).

Таким образом, ионообменная хроматография позволила разделить изоформы и получить изоферменты в высокоочищенном состоянии. Гомогенность полученных препаратов изоферментов СДГ подтверждена методом электрофореза в ПААГ.

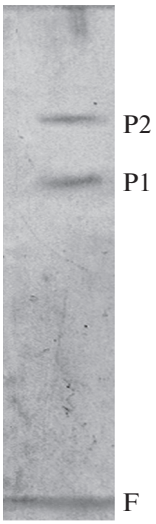


**Рис. 1.** Изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы щитков кукурузы на 8 сут прорастания: P1 – первая изоформа, P2 – вторая изоформа, F – фронт красителя.

Электрофорез в 7.5%-ном ПААГ с последующей окраской геля нитратом серебра показал гомогенность полученных ферментативных препаратов, о чем свидетельствовало наличие только одной белковой полосы в каждом из них (рис. 2).

Компоненты, определенные после специфического проявления активности СДГ и окрашивания белка, совпадали и характеризовались мигрированием в геле с $R_f$, равным 0.28 и 0.34 для первой и второй форм соответственно. Таким образом, было установлено, что в щитке кукурузы на 8 сут прорастания семян присутствовали 2 формы фермента, а проведенный электрофорез в ПААГ показал, что выделенные из них ферменты были электрофоретически гомогенны (рис. 2).

С помощью специфического проявления активности СДГ, осуществленного тетразолиевым

**Таблица 1.** Очистка сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы ($n = 4$, $p \leq 0.05$)

| Стадия очистки | Объем фракций, мл | Количество белка, мг | Общая активность, Е | Удельная активность, Е/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Гомогенат | 10 | 74.05 | 2.30 | 0.034 | 100 | 1 |
| Фракционирование сульфатом аммония 20–60% | 6 | 6.86 | 0.86 | 0.125 | 37.42 | 3.68 |
| Гель-фильтрация на сефадексе G-25 | 4 | 3.85 | 0.95 | 0.240 | 41.34 | 13.14 |
| Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе | 1* 2 | 0.19 | 0.22 | 1.130 | 9.44 | 61.86 |
| | 2** 2 | 0.14 | 0.12 | 0.833 | 5.07 | 45.61 |

* 1 – первая изоформа, ** 2 – вторая изоформа сукцинатдегидрогеназы.

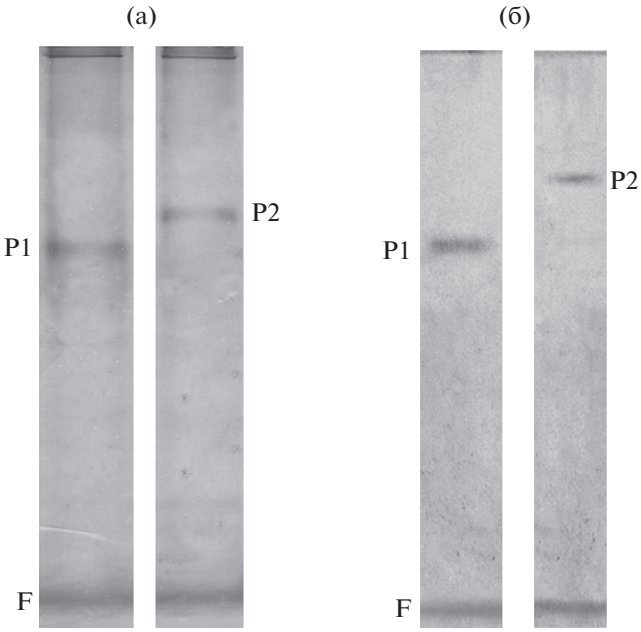


**Рис. 2.** Электрофорез сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы в 7%-ном ПААГ после окрашивания нитратом серебра (а) и специфического окрашивания на активность фермента (б): P1 – первая изоформа, P2 – вторая изоформа, F – фронт красителя.

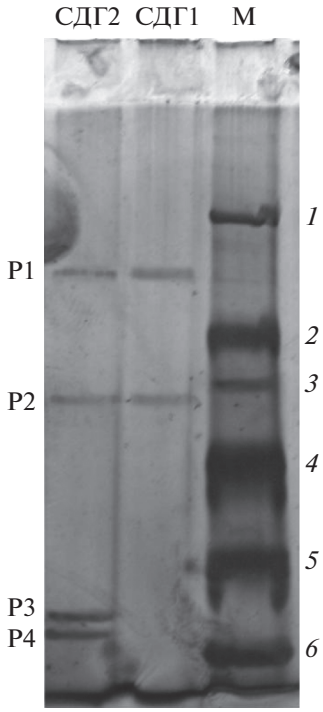


**Рис. 3.** Электрофорез изоферментов СДГ в ПААГ с ДДС-Na: P1 – P4 – субъединицы, M – белки- маркеры молекулярной массы (кДа): *1* – целлюлаза (94.6), *2* – бычий сывороточный альбумин (66.2), *3* – яичный альбумин (45), *4* – карбоангидраза (31), *5* – ингибитор трипсина (21.5) и *6* – лизоцим (14.4).

методом, было установлено, что белковые компоненты, обнаруженные на электрофореграммах, обладали сукцинатдегидрогеназной активностью (рис. 2б). При этом было показано присутствие в щитках кукурузы 4 изоформ фермента с $R_f$ 0.28 и 0.34.

У арабидопсиса, модельного растительного объекта, СДГ в растительном организме кодируется набором генов, который может достигать 8. В связи с этим формирование множественных молекулярных форм этого фермента могло быть обусловлено различной дифференциальной экспрессией этих генов и комбинацией пептидных компонентов. Поэтому с целью установления набора входящих в состав полученных изоферментов белковых компонентов необходимо изучение их субъединичного строения.

Для изучения четвертичной структуры белковых молекул изоферментов СДГ из щитков кукурузы использовали метод электрофореза в присутствии денатурирующего агента – додецилсульфата натрия (**ДДС-Na**). Нативную молекулу каждой формы СДГ денатурировали ДДС-Na, что позволяло обнаружить присутствие субъединиц белка. Результаты электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na приведены на рис. 3. Было установлено субъединичное строение изоферментов СДГ и определена молекулярная масса отдельных субъединиц. При этом молекула СДГ2 содержала 4 субъединицы с различной молекулярной массой. Большая субъединица имела молекулярную массу 72 кДа, средняя – 37 кДа, малые 13 и 15 кДа. Таким образом, можно заключить, что исследуемая форма СДГ2 представляла собой гетеротетрамер.

Изучение субъединичного строения молекулы СДГ1 показало, что она представляла собой гетеродимер и состояла из 2 субъединиц с молекулярными массами 72 и 37 кДа. Сопоставление этих данных с данными, полученными с помощью гель-хроматографии, позволило заключить, что обе формы изучаемого фермента являлись гетеропептидами.

Величины константы Михаэлиса для изоферментов СДГ из щитков кукурузы определяли по методу Лайнуивера-Берка в системе двойных обратных координат.

Было установлено, что для первой изоформы величина $K_м$ соответствовала 0.38 мМ, а для второй изоформы – 0.14 мМ. Анализ полученных значений $K_м$ свидетельствовал, что сродство второй изоформы СДГ к сукцинату было выше, чем для первой.

Изучение зависимости активности изоферментов СДГ от pH среды показало, что pH-оптимумы для СДГ1 и СДГ2 находились при 7.0 и 8.0 (рис. 4).

Показано также, что СДГ1 характеризовалась высокой каталитической активностью при более низком значении pH по сравнению со второй изоформой (рис. 5).

Изменения свойств изоферментов могли отражаться на их функционировании в щитках кукурузы в условиях изменения типа питания растений с гетеротрофного на автотрофный.

Ранее рядом исследователей было показано, что малонат является конкурентным ингибитором для СДГ, выделенной из различных организмов [20–22]. Было установлено, что $K_i$ по малонату для СДГ1 составляла 0.5 мМ, при этом для СДГ2 данный показатель был выше и равнялся 0.95 мМ (рис. 5). Установлено, что малонат ингибировал скорость реакции у изоферментов СДГ из щитков кукурузы. При этом ингибирование изофермента СДГ2 происходило при более низких концентрациях малоната, что указывало на его большую чувствительность к ингибитору. Такая разница полученных значений констант ингибирования могла быть обусловлена разницей в структуре изучаемых изоферментов, связанной с их различной генетической детерминацией.

Было изучено влияние малоната на активность изоформ СДГ, поскольку в ряде работ [21, 22] он описывался как один из самых сильных конкурентных ингибиторов. Ранее было показано, что оксалоацетат является более сильным ингибитором СДГ, чем малонат. Это связывают с его защитной функцией против обратного тока электронов по дыхательной цепи митохондрий к первому комплексу, что имеет большое значение для снижения образования активных форм кислорода [23].

Таким образом, был разработан эффективный способ очистки изоферментов СДГ из щитков кукурузы на поздних этапах прорастания. Использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе позволило разделить две изоформы СДГ. Изоферменты СДГ десорбировались с ДЭАЭ-целлюлозы при разных концентрациях хлорида калия, что могло указывать на различие структурной организации их полипептидных компонентов.

Электрофоретические исследования очищенных препаратов изоферментов СДГ показали, что каждый из них электрофоретически гомогенен.

Оказалось, что физико-химические свойства и кинетические характеристики выделенных изоферментов значительно различались. Установлены различия их четвертичной структуры. Так, изофермент СДГ1 представлял собой гетеротетрамер, а СДГ2 – гетеродимер. Это было подтверждено при определении молекулярных масс нативных изоферментов с помощью электрофореза в ПААГ с Na-ДДС.

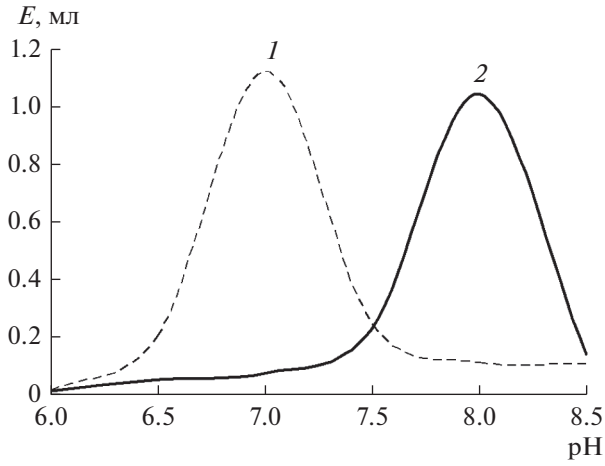


**Рис. 4.** Влияние pH на активность (Е/мл) изоферментов СДГ1 (*1*) и СДГ2 (*2*) из щитков кукурузы.

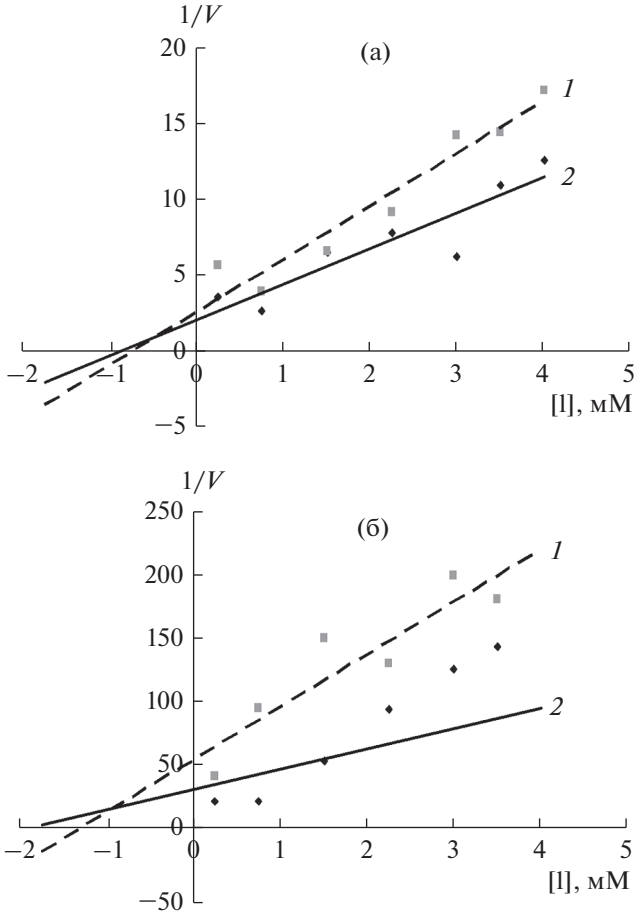


**Рис. 5.** Определение константы ингибирования малонатом изофермента СДГ1 (а), СДГ2 (б) в присутствии 1 (*1*) и 2 мМ (*2*) сукцината натрия.

Определены значения $K_м$ для СДГ1 и СДГ2. При этом наименьшее сродство к субстрату характерно для первой формы. Различные кинетические и каталитические характеристики изоформ свидетельствовали об их участии в катализе различных метаболических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00150).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю.* Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла. Воронеж: Центр.-Черн. Книжное изд-во, 2005. 224 с.
2. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Sazonova O.V., Igamberdiev A.U.* // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 102. P. 161–166.
3. *Figueroa P., Leon G., Elorza A., Holuigue L., Araya A., Jordana X.* // Plant Mol. Biol. 2002. V. 50. № 4–5. P. 725–734.
4. *Millar A.H., Eubel H., Jänsch L., Kruft V., Heazlewood J.L., Braun H-P.* // J. Plant Mol. Biol. Biotech. 2004. V. 56. № 1. P. 77–90.
5. *Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ахмад Дж.А., Попов В.Н.* // Известия РАН. Серия биологическая. 2010. № 3. С. 324–332.
6. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U.* // J. Plant Physiol. 2016. V. 205. № 1. P. 33–40.
7. *Епринцев А.Т., В.Н. Попов, Д.Н. Федорин.* Сукцинатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: Центр. Черн. Книжное изд-во, 2010. 184 с.
8. *Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н.* // Физиология растений. Т. 54. 2007. № 3. С. 409–415.
9. *Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н.* // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 332–340.
10. *Elorza A., Roschzttardtz H., Go'mez I., Mouras A., Holuigue L., Araya A., Jordana X.* // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. № 1. P. 14–21.
11. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Nikitina M.V., Igamberdiev A.U.* // J. Plant Physiol. 2015. V. 181. № 1. P. 14–19.
12. *Епринцев А.Т.* Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации? М.: Академкнига, 2007. 231 с.
13. *Пинейру де Карвалью М.А.А., Землянухин А.А., Епринцев А.Т.* Малатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: Издательство ВГУ, 1991. 216 с.
14. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
15. *Davis B.J.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. № 2. P. 404–427.
16. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
17. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
18. *Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T.* // Front Plant Sci. 2016. V. 15. № 7. P. 1042. https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2016.01042
19. *Day D.A., Dry I.B., Soole K.L., Wiskich J.T., Moore A.L.* // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 3. P. 948–953.
20. *Епринцев А.Т., Попов В.Н.* Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1999. 192 с.
21. *Valls-Lacalle L., Barba I., Miró-Casas E., Alburquerque-Béjar J.J., Ruiz-Meana M., Fuertes-Agudo M., Rodríguez-Sinovas A., García-Dorado D.* // Cardiovasc Res. 2016. V. 109. № 3. P. 374–384.
22. *Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H.* // Plant Physiol. 2017. V. 173. № 4. P. 2029–2040.
23. *Muller F.L., Liu Y., Abdul-Ghani M.A., Lustgarten M.S., Bhattacharya A., Jang Y.C., Van Remmen H.* // Biochem J. 2008. V. 409. № 2. P. 491–499.

# Purification in a Homogeneous State of Constitutive Isoenzymes of Succinate Dehydrogenase from the Scutellum of Mays and the Study of Their Characteristics

**A. T. Eprintsev[a], * and D. N. Fedorin[a]**

[a]*Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia*

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

Received September 2, 2019; revised September 30, 2019; accepted November 1, 2019

The use of a modified 4-stage purification scheme made it possible to obtain electrophoretically homogeneous preparations of constitutive forms of succinate dehydrogenase from mays scutellum in the late stages of germination. It was found that isoenzymes significantly differed in quaternary structure. So, succinate dehydrogenase 1 turned out to be a heterotetramer, and succinate dehydrogenase 2 turned out to be a heterodimer. It was found that their main catalytic and kinetic characteristics also differed, in particular, their affinity for the substrate (succinate) and the pH optimum value of the catalyzed reaction. Succinate dehydrogenase 2 was characterized by increased resistance to a specific inhibitor, malonate.

*Keywords:* isoforms, succinate dehydrogenase, DEAE-cellulose, subunit, Michaelis constant, pH optimum, inhibition

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 147–155

УДК 577.13

# ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ СИБИРСКИХ ШТАММОВ ГРИБОВ *Heterobasidion annosum* sensu lato

© 2020 г. Т. В. Антипова[1], В. П. Желифонова[1], Ю. А. Литовка[2, 3], И. Н. Павлов[2, 3], Б. П. Баскунов[1], А. А. Тимофеев[2, 4], А. Г. Козловский[1, *]

[1]*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, 142290 Россия*

[2]*Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия*

[3]*Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, 660049 Россия*

[4]*Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", Красноярск, 660036 Россия*

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

Поступила в редакцию 29.09.2019 г.
После доработки 15.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Изучен состав вторичных метаболитов у базидиальных грибов рода *Heterobasidion*, выделенных на территории Средней и Западной Сибири, а также Южной Кореи. На основе морфолого-культуральных и молекулярно-генетических методов установлена принадлежность исследуемых культур к видам *H. annosum* (Fr.) Bref. (5 штаммов), *H. abietinum* Niemelä & Korhonen (4 штамма) и *H. ecrustosum* Tokuda, T. Hatt. & Y.C. Dai (1 штамм). В профиле метаболома трех штаммов *H. annosum* и всех штаммов *H. abietinum* преобладал фоманноксин. Два штамма *H. annosum* синтезировали близкие по структуре к фоманноксину соединения 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)- бензофуран-5-карбальдегид. У *H. annosum* 45-2 были идентифицированы фоманнозин и его предшественники. Показано, что состав ферментационной среды оказал влияние на количество и состав синтезируемых метаболитов. В условиях *in vitro* все исследуемые штаммы *H. annosum* и *H. abietinum* проявляли фитопатогенное действие в отношении сеянцев *Pinus sylvestris* L., вызывая различной степени некротическое поражение стеблей и гибель растений. Более высокая фитопатогенность была характерна для штаммов *H. annosum*, максимальная агрессивность, наибольшее разнообразие соединений в профиле метаболома и активная продукция фоманноксина отмечена у *H. annosum* 45-2.

*Ключевые слова: Heterobasidion annosum* sensu stricto, *Heterobasidion abietinum*, корневая губка, фитопатогенность, фоманноксин, фоманнозин

**DOI:** 10.31857/S0555109920020038

Проблема корневых гнилей хвойных пород, вызываемых фитопатогенными грибами рода *Heterobasidion*, привлекает пристальное внимание вследствие огромных размеров ущерба, причиняемого лесному хозяйству [1, 2]. К наиболее опасным и вредоносным возбудителям корневых и комлевых гнилей хвойных растений относят грибы комплекса *H. annosum* sensu lato (**s. l.**) (корневая губка) [3–7]. Этот комплекс состоит из пяти видов грибов, распространенных в умеренных климатических регионах планеты. Виды комплекса различаются по морфологическим, генетическим и экологическим признакам, а также географическому распространению. Виды *H. annosum* senso stricto (**s. s.**) (Fr.) Bref., *H. abietinum* Niemela & Korhonen и *H. parviporum* Niemelä & Korhonen распространены повсеместно в Евразии. Виды *H. irregulare* (Underw.) Garbelotto & Otrosina и *H. occidentale* Otrosina & Garbelotto встречаются в Северной Америке [2]. В Сибири грибы рода *Heterobasidion* представлены преимущественно видами *H. annosum* и *H. abietinum*. Наибольший вред корневая губка наносит насаждениям *Pinus sylvestris* L. в ленточных борах Минусинской котловины и Алтайского края [8–10]. Все они являются эндофитами и сапро-некротрофными фитопатогенами, паразитирующими на более чем двухстах видах растений.

Механизм заражения деревьев *H. annosum* s. l. представляет собой инфицирование смешанного типа [2]. Первичное инфицирование происходит воздушно-капельным путем, преимущественно базидиоспорами на свежеповрежденные поверхности деревьев (верхушки пней и стволовые и кор-

невые раны). После основного заражения может возникнуть вторичное инфицирование неповрежденных деревьев за счет вегетативного роста мицелия и его распространения через корневые контакты. К важным факторам в патогенезе корневой губки относятся ферментные системы, активно разлагающие биополимеры древесины, а также низкомолекулярные соединения. Известно, что грибы комплекса *H. annosum* s. l. способны продуцировать вторичные метаболиты – фоманнозин, фоманноксин, фомаджорины и др. [11–13]. Показано, что фоманноксин и фоманнозин обладают антибактериальной, антифунгальной и фитотоксичной активностью [12]. Недавно установлено, что фоманноксин является ингибитором биосинтеза бета-амилоидного пептида, который вовлечен в развитие болезни Альцгеймера [14].

Работы по изучению видовой принадлежности изолятов корневой губки, географического места их выделения, спектра метаболитов и их биологической активности единичны [13]. В настоящее время отсутствуют данные о составе вторичных метаболитов у сибирских штаммов различных видов *Heterobasidion* и их связи с фитопатогенностью.

Цель работы – изучение *in vitro* биосинтеза вторичных метаболитов и фитопатогенности у 10 штаммов грибов рода *Heterobasidion*, выделенных из хвойных насаждений с различной степенью патологического опада на территории Средней и Западной Сибири, а также Южной Кореи (о. Чеджу).

## МЕТОДИКА

**Выделение и идентификация штаммов.** Объектами исследования служили 10 штаммов H1, H2, H3, H4, A-Ha-1, K-Ha-4, Ho-16K, Hp-8, T-Ha и 45-2 грибов рода *Heterobasidion* из коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). Штаммы были выделены в 2014–2018 гг. из плодовых тел и базидиом *Heterobasidion*, произраставших на различных хвойных породах, либо (в единичном случае) из древесины поваленного дерева с характерными признаками поражения корневой губкой. Штаммы были изолированы в чистые культуры на селективных питательных средах: мальт-экстракт-агар (**МЭА**), содержащий 0.5% танина и Норкранс-агар (**НРКА**) [15, 16]. Хранение культур осуществляли на скошенном МЭА при 6°C.

Морфологические признаки изучали у грибов, выращенных на морковном агаре, МЭА и НРКА при 24 ± 1°C. Микроструктуры оценивали методами фазово-контрастной и светопольной микроскопии с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse Ci с системой фотодокументации (“Nikon”, Япония) и электронного сканирующего микроскопа Hitachi SEM TM-1000 с 10000 кратным увеличением и разрешением 30 нм (“Hitachi Ltd.”, Япония). Видовую идентификацию штаммов верифицировали молекулярно-генетическими методами. Секвенирование участков генетических маркеров ITS (*internal transcribed spacer*) и TEF-1alpha (*transcription elongation factor 1-alpha*) проводили на секвенаторе Illumina MySeq (“Illumina”, США) с использованием оборудования ЦКП “Инновационные технологии защиты растений” Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург-Пушкин, Россия) и ЦКП “Геномика” (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). ДНК выделяли по методу фенол-хлороформной экстракции [17]. Таксономическое положение штаммов и эволюцию определяли с помощью программного обеспечения MEGA-X [18, 19]. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями известных штаммов из базы NCBI (Information, U.S. National Library of Medicine).

**Условия культивирования грибов, выделение, идентификация и количественное определение вторичных метаболитов**. При изучении продукции вторичных метаболитов штаммы культивировали в глубинных условиях в колбах (750 мл) со 100 мл среды на шейкере (220 об./мин) в течение 11 сут при 24°C. При скрининге была использована синтетическая среда НРК [16]. Для сравнения биосинтетической способности продуктивных штаммов использовали две органно-минеральные среды. Среда 2 содержала (г/л дистиллированной воды): глюкозу – 5.0, мальт экстракт – 5.0, $KH_2PO_4$ – 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, pH 5.5 [20]. Среда 3, имела следующий состав (г/л дистиллированной воды): глюкоза – 4.0, дрожжевой экстракт – 4.0, мальт-экстракт – 10.0, pH 5.5 [21]. Среды засевали 7-суточным мицелием, выращенным глубинно в среде, содержавшей 3% мальт-экстракта.

Вторичные метаболиты экстрагировали из фильтрата культуральной жидкости хлороформом трехкратно при pH 3 и 8. Экстракты анализировали методом ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel $F_{254}$, “Merck”, Германия) в системах хлороформ–метанол–25%-ный аммиак (90 : 10 : 0.1) и хлороформ–ацетон (93 : 7). Метаболиты обнаруживали по поглощению и флуоресценции при 254 и 366 нм. Метаболиты выделяли с помощью препаративной ТСХ (**ПТСХ**) на пластинках силикагеля (Silica gel $F_{254}$, “Merck”, Германия) в системах растворителей. Идентификацию выделенных метаболитов осуществляли на основе сравнения данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными источниками [11–13, 22, 23]. Подробную информацию о структуре соединений получали при анализе МС/МС спектров при энергии коллизии 20–40%.

УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япо-

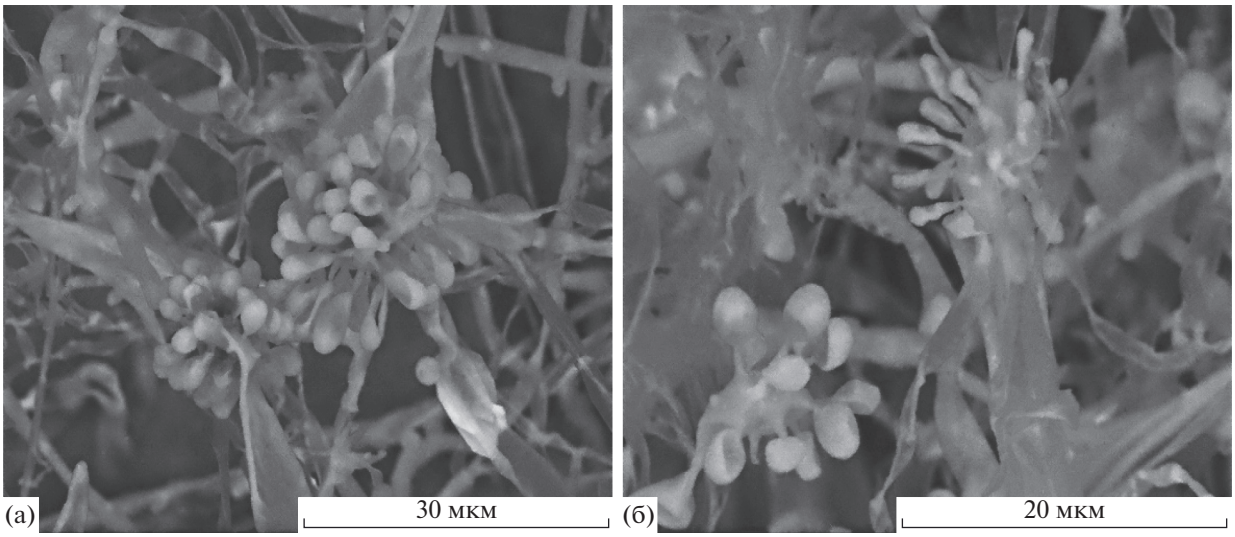


**Рис. 1.** Растровая электронная микроскопия вегетативных (мицелий) и репродуктивных (апикальные везикулы с конидиями) структур *H. annosum* s. s. (а, увеличение ×2500) и *H. abietinum* (б, увеличение ×4000).

ния). Масс-спектры соединений регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (“Thermo Finnigan”, Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в камеру для химической ионизации.

Количественное содержание фоманноксина определяли спектрофотометрически после ПТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel $F_{254}$, “Merck”, Германия) в метаноле при 280 нм. Расчет проводили, используя калибровочную кривую для фоманноксина.

**Исследование фитопатогенной активности штаммов.** Фитопатогенность оценивали по модифицированному методу [24] с использованием для культивирования грибов полужидкой питательной среды НРК.

Поверхностно стерилизованные семена *P. sylvestris* проращивали в течение 8–10 сут на поверхности 5%-ного водного агара при 20°С. Проростки перед инфицированием выдерживали при 4°С в течение времени, необходимого для достижения длины корней 1.5–2.5 см, а затем помещали на поверхность 10-суточной культуры гриба так, чтобы их корни были погружены в полужидкую питательную среду НРК. Посевы инкубировали в климатокамере (“Jeio Tech”, Корея) с 12 ч фотопериодом в течение 18 сут при 22°С. По окончании эксперимента оценивали жизнеспособность растений (% от контроля), длину надземной части здоровых проростков (мм), агрессивность штамма грибов (% растений с некрозом от общего количества растений).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование морфолого-культуральных особенностей подтвердило принадлежность изучаемых культур к роду *Heterobasidion*, а изучение их микроструктур методами растровой электронной микроскопии не выявило значительных микроморфологических различий. На плотных питательных средах формировался хорошо развитый воздушный мицелий с полупрозрачными, тонкостенными генеративными гифами, имеющими септы. Гифы, ветвящиеся под острым, реже под прямым углом, были шириной 1.5–5.0 мкм. Анастомозы протяженностью от 2 до 40 мкм – умеренные. Редкие и простые пряжки размером 2.0–5.5 мкм располагались на прямой широкой гифе. Конидиофоры с апикальной конидиогенной везикулой – прямостоячие, простые или разветвленные, гиалиновые до 200 мкм в длину и 4–10 мкм в диаметре. Диаметр апикальной везикулы составлял 6–15 мкм, поверхность была с коническими зубцами, на которых располагались многочисленные конидии. Конидии размером 3.5–8.0 × × 2.5–6.5 мкм были одноклеточные, гладкие и гиалиновые, они имели форму от яйцевидной до почти шаровидной (рис. 1).

Видовую идентификацию проводили с использованием молекулярно-генетических методов, включающих секвенирование участков генетических маркеров ITS и TEF-1alpha с последующим биоинформатическим анализом. Филогенетическое дерево (рис. 2) построено по методу попарного внутригруппового невзвешенного среднего [18] и модели [25] с bootstrap тестом [26] в 10000 репликаций. Всего было проанализировано 29 нуклеотидных последовательностей, при этом генетическое расстояние между видами составило не менее 0.015. Филогенетический анализ консервативных регионов ДНК изученных культур грибов позволил установить четыре устойчивых клада, характерных для видового разделения, и определить принадлежность штаммов Н-2, А-На-1, К-На-4,

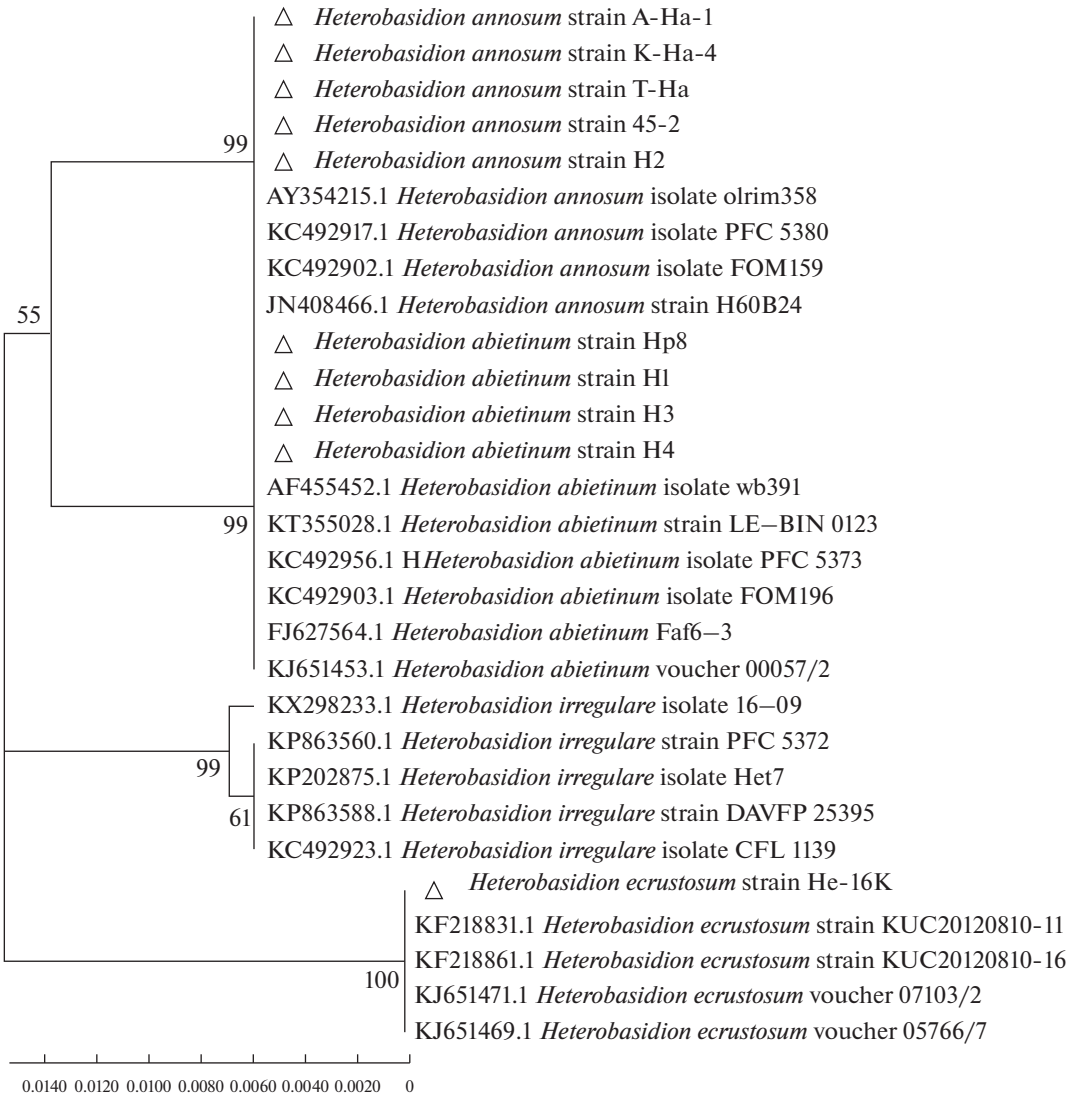


**Рис. 2.** Филогенетическое дерево грибов *Heterobasidion sp.,* составленное на основании сравнительного анализа региона ITS1-ITS2 (△ – обозначены исследуемые штаммы).

Т-На и 45-2 к виду *H. annosum* s. s. (Fr.) Bref., штаммов Hp-8, H-1, H-3 и H-4 к виду *H. abietinum* Niemelä & Korhonen и штамма He-16K к виду *H. ecrustosum* Tokuda, T. Hatt. & Y.C. Dai.

Вторичные метаболиты у *Heterobasidion* изучали после выращивания штаммов в среде HPK, которая обычно применяется при культивировании базидиомицетов [16]. У всех изученных штаммов видов *H. annosum* s. s. и *H. abietinum* был обнаружен метаболит **1**, мигрирующий при ТСХ с R*f* = 0.29 (II). УФ-спектр метаболита **1** имел значения полос поглощения ($\lambda_{макс}$ 209, 232, 278, 294 нм), близкие фоманноксину, и положительный молекулярный ион 207$(M + H)^+$. В МС/МС спектре также наблюдалось отщепление двух карбоксильных фрагментов и гидроксильной группы. На основании полученных данных метаболит был идентифицирован как 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид. У этих штаммов также был идентифицирован метаболит **2**, который имел молекулярный ион 205$(M + H)^+$, характер расщепления которого был аналогичен предыдущему с разницей в две единицы, что могло указывать на появление двойной связи в фурановом кольце, он представлял собой 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид (табл. 1).

У штаммов *H. annosum* Т-На, 45-2 и Н-2 и *H. abietinum* Hp-8, H-1, H-3 и H-4 основным метаболитом было соединение **3,** мигрирующее при ТСХ с R*f* = 0.52 (II). УФ-спектр выделенного метаболита имел максимальные значения полос поглощения при 209, 228, 280 (пл.) и 293 нм. Масс-спектр метаболита **3** показал положительный молекулярный ион 189 $(M + H)^+$. В МС/МС спектре метаболита наблюдали последовательное отщепление двух карбоксильных и пропенильной групп (табл. 2). На

**Таблица 1.** Физико-химические свойства выделенных метаболитов грибов рода *Heterobasidion*

| № | Метаболит | УФ-спектр, $\lambda_{макс.}$, нм | Энергия коллизии/молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС-спектрах (интенсивность, %) |
|---|---|---|---|
| | | | $[M + H]^+$ |
| 1 | 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид | 209, 232, 278 (пл.), 294 | 24/207(96), 189(100), 161(39), 147(10), 135(24), 107(10) |
| 2 | 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид | 209, 232, 278 (пл.), 294 | 25/205 (86), 187(60), 159(92), 149(36), 135(100), 107(54) |
| 3 | Фоманноксин | 209, 228, 280(пл.), 293 | 25/189(51), 161(100), 133(8), 119(12) |
| 4 | 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2 диол | 209, 230, 290 | 25/217 (90),199(100),175 (66) |
| 5 | Иллудолактон А | 256 | 22/247(86), 229(100), 219(22), 205(29), 201(50) |
| 6 | Метилиллудолактон А | 259 | 20/261(69), 247(47), 229(100), 201(7) |
| 7 | Фоманнозин | 256 | 22/263(82), 245(100), 227(11) |

основании литературных данных этот метаболит был идентифицирован как фоманноксин.

У изучаемых штаммов при ТСХ также был также обнаружен метаболит **4** с R*f* = 0.18 (II), который имел УФ-спектр с максимальными значениями полос поглощения при 209, 230 и 290 нм и масс-спектр с положительным молекулярным ионом 217 $(M + H)^+$. МС/МС спектр метаболита **4** указывал на наличие двух гидроксильных групп. Метаболит **4** был идентифицирован как 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2-диол.

Штамм *H. annosum* 45-2 синтезировал метаболит **5**, мигрирующий с R*f* = 0.47 при ТСХ (II), который имел УФ-спектр с $\lambda_{макс}$ = 256 нм, характерный для сесквитерпена фоманнозина. Масс-спектр метаболита **5** характеризовался положительным молекулярным ионом 247$(M + H)^+$ и наличием гидроксильной и карбонильной групп. На основании полученных данных этот метаболит был идентифицирован как иллудолактон А. У данного штамма также был обнаружен метаболит **6**, мигрирующий с R*f* = 0.25 (II) при ТСХ, который имел УФ-спектр с $\lambda_{макс}$ = 259 нм и молекулярный ион 261 $(M + H)^+$, отличающейся от предыдущего метаболита метильной группой. Этот метаболит не был идентифицирован, но УФ-спектр и фрагментация молекулярного иона, схожие с иллудолактоном А, позволяли предположить, что этот метаболит являлся метильным производным иллудолактона А. В органо-минеральной среде **3** *H. annosum* 45-2 помимо указанных выше метаболитов синтезировал метаболит **7,** который имел УФ-спектр с $\lambda_{макс}$ = 256 нм и масс-спектр с положительным молекулярным ионом 263 $(M + H)^+$. Этот метаболит был идентифицирован как фоманнозин. У штамма *H. ecrustosum* He-16 K вышеуказанные вторичные метаболиты не были идентифицированы.

Установлено, что изопреноидный блок фоманноксина образуется из фарнезилдифосфата, предшественником которого является мевалоновая кислота [11]. Ароматическое кольцо соединения синтезируется по шикиматному пути при последовательном элиминировании пирувата из хоризмовой кислоты с образованием гидроксибензойной кислоты с последующим восстановлением до альдегида (рис. 3). Далее в биосинтетическом пути наступает ключевая реакция, ведущая к образованию фоманноксина, а именно алкилирование ароматического кольца изопреноидной единицей, которое осуществляется пренилтрансферазой. Дальнейшая окислительная циклизация приводит к образованию бензогидрофуранового скелета и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегида, из которого путем элиминирования воды образуется либо фоманноксин, либо в результате окисления 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид. Из фоманноксина под действием пируватдекарбоксилазы и последующего восстановления образуется 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2-диол. Биосинтез фоманнозина начинается с циклизации универсального предшественника сесквитерпенов фарнезилпирофосфата с образованием $\Delta^6$-протоиллудена предположительно под действием терпенциклазы [12]. Окисление протоиллудена монооксигеназами и дегидрогеназами с образованием иллудола, иллудолактона А и других промежуточных соединений приводит к образованию фоманнозина.

Таким образом, в спектре всех исследованных штаммов вида *H. abietinum* и трех штаммов *H. annosum* присутствовало 4 метаболита фоманноксинового ряда с преобладанием фоманноксина. Это предполагает функционирование у них двух энзиматических путей, преобразующих 2-(2-гидрокси-

**Таблица 2.** Вторичные метаболиты штаммов грибов рода *Heterobasidion,* выделенных из хвойных пород деревьев в различных географических регионах

| Метаболиты | *H. abietinum* | | | | *H. annosum* | | | | | *H. ecrustosum* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Нр-8 | Н-1 | Н-3 | Н-4 | Н-2 | К-На-4 | Т-На | 45-2 | А-На-1 | Не-16К |
| | Красноярский край | | | | | | | | Алтай | Ю. Корея |
| | *Larix sibirica* | *Abies sibirica* | *Pinus koraiensis* | *Picea obovata* | *Abies sibirica* | *Pinus sylvestris* | | *Abies sibirica* | *Pinus sylvestris* | *Pinus thunbergii* |
| Фоманноксин | + | + | + | + | + | – | + | + | – | – |
| 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбаль-дегид | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – |
| 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-гидробензофуран-5-карбальдегид | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – |
| 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2 диол | + | + | + | + | + | – | + | + | – | – |
| Иллудолактон А | – | – | – | – | – | – | – | + | – | – |
| Метилиллудолактон А | – | – | – | – | – | – | – | + | – | – |
| Фоманнозин | – | – | – | – | – | – | – | +* | – | – |

* Среда 3; "–" – метаболиты не обнаружены.

пропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид. Однако у двух штаммов *H. annosum* наблюдался только процесс окисления этого соединения. В то время как у штамма *H. annosum* 45-2 активно функционировали пренилтрансферазы и терпенциклазы, ключевые ферменты, ведущие к образованию метаболитов фоманноксиного и фоманнозиного ряда.

Известно, что филогенетически близкие виды могут синтезировать сходный профиль вторичных метаболитов [13]. Проведенные исследования по установлению связи между видами грибов комплекса *H. annosum* s. l. и спектром вторичных метаболитов показало, что образование фоманноксина явилось определяющим фактором для видов *H. annosum* s. s. и *H. irregulare*. Вид *H. irregulare* отличался биосинтезом сесквитерпена-дезоксифоманнозина А, а характерной особенностью видов *H. abietinum, H. occidentale* была продукция эпоксидрименола и его производных. У изученных штаммов фоманноксин преобладал у трех штаммов *H. annosum*, а у двух других были обнаружены метаболиты, близкие ему по структуре. Эти результаты соответствовали предложенным хемотаксономическим критериям для вида *H. annosum* s. s. У фоманноксин-синтезирующего штамма *H. annosum* 45-2 был идентифицирован фоманнозин и его биосинтетические предшественники, ранее обнаруженные у видов *H. irregulare* и *H. occidentale* [11, 12]. У всех изученных штаммов вида *H. abietinum* был найден фоманноксин и близкие ему соединения, в то время как отсутствовал эпоксидрименол, характерный для этого вида по данным [13]. Можно предположить, что образование фоманноксина у грибов этого комплекса определяется регуляцией генов его биосинтетического пути в зависимости от применяемых условий культивирования.

Изучение фитопатогенности сибирских штаммов *Heterobasidion,* проведенное в условиях *in vitro*, показало, что все штаммы видов *H. annosum* и *H. abietinum* проявляли фитопатогенное действие на сеянцы *P. sylvestris*, вызывая некротическое поражение стеблей и гибель растений. Было обнаружено, что показатели вирулентности штаммов вида *H. annosum* оказались выше, чем у штаммов вида *H. abietinum* (табл. 3). Максимальную вирулентность проявлял *H. annosum* 45-2*,* выделенный из плодового тела, произраставшего на *A. sibirica* (Красноярский край, Россия) и синтезирующий наиболее широкий спектр вторичных метаболитов. Жизнеспособность сеянцев на 6 сут составила 37% на фоне замедления развития стебля по сравнению с контролем в 3.5 раза и массовых некротических поражений (до 70% от общего количества растений). На 12 сут инкубации была отмечена 100%-ная гибель *P. sylvestris*. На момент завершения эксперимента (18 сут) 100%-ную гибель сеянцев наблюдали при воздействии *H. annosum* А-На-1 и К-На-4, выделенных с плодовых тел, произраставших на *P. sylvestris* (Красноярский край и Алтай соответственно, Россия) (табл. 2). Показатели вирулентности *H. annosum* Т-На и Н2, выделенных с плодового тела, произраставшего на *P. sylvestris*, и пораженной древесины *A. sibirica* (Красноярский край, Россия) были несколько ниже. Жизнеспособность сеянцев на 18 сут составила около 30% на фоне замедления в 2 раза

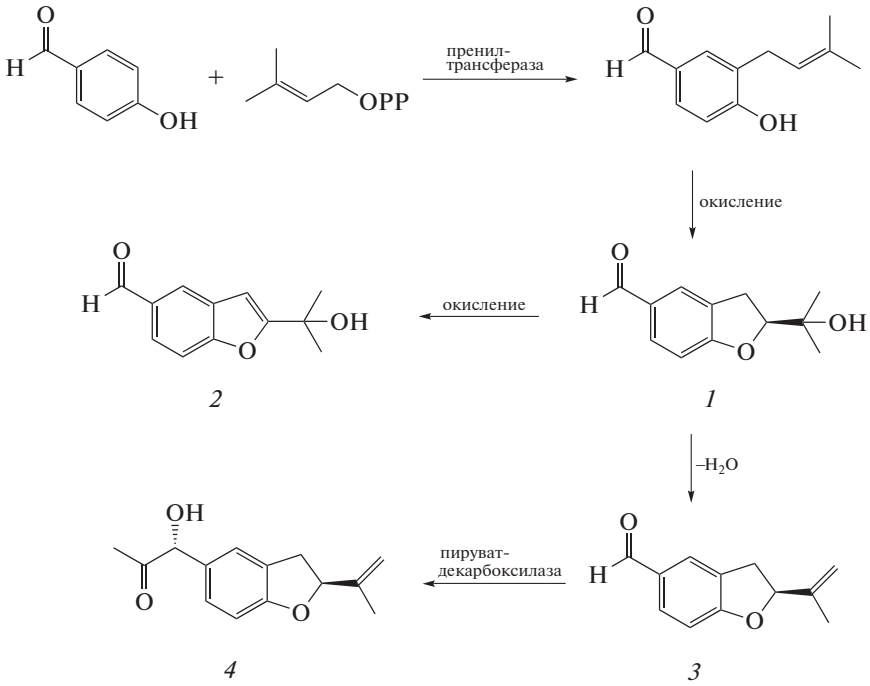


**Рис. 3.** Предполагаемый биосинтез фоманноксина и соединений, близких ему по структуре [13]: *1* – 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид; *2* – 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид; *3* – фоманноксин; *4* – 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)-пропан-1,2-диол.

развития стебля по сравнению с контролем и некротических поражений до 93% от общего количества растений.

Вирулентность штаммов вида *H. abietinum* оказалась ниже по сравнению со штаммами *H. annosum* (табл. 3). На 18 сут эксперимента жизнеспособность растений варьировала от 47 до 59% на фоне замедления в 1.6–1.8 раза развития стебля по сравнению с контролем и некротических поражений от 70 до 92% от общего количества растений. Эти штаммы были выделены в Красноярском крае (Россия) с плодовых тел, произраставших на *A. sibirica*, *P. koraiensis* и *P. obovata* соответственно. К высоковирулентному штамму можно было отнести *H. abietinum* Hp-8, изолированный из плодового тела с *L. sibirica* в Красноярском крае. Корейский штамм *H. ecrustosum* He-16K, выделенный из плодового тела на *P. thunbergii*, характеризовался отсутствием выраженной вирулентности. Так, на 18 сут эксперимента жизнеспособность растений и распространение некроза мало отличалось от контроля (табл. 3).

Известно, что фоманноксин является фактором вирулентности грибов *Heterobasidion* [23, 27]. Было показано, что обработка сеянцев *Picea sitchensis* 150 мкг/мл фоманноксина через 3 нед. инкубации приводила к быстрому отмиранию корней, хлорозу и опаданию игл. Была установлена *in vitro* прямая зависимость между концентрацией этого метаболита в среде и прорастанием семян *Sitka spruce*. Фоманноксин оказался единственным вторичным метаболитом *Heterobasidion*, который был выделен в концентрации 0.3 мкг/г древесины из зараженной части дерева перед грибными гифами [27]. Эти результаты позволили сделать вывод, что токсин секретируется в растительную ткань перед началом грибной инфекции. Наличие в тканях токсина приводило к гибели клеток растений и способствовало дальнейшему распространению гиф гриба и разрушению древесины.

Для фоманнозина и иллудолактона А также показана фитотоксичная активность [12]. Эти соединения вызывали локальный некроз, приводящий к системной гибели сосны *Pinus taeda*. Было показано также, что фоманнозин ингибировал рост суспензии клеток ели, *Picea abies* и *Nicotiana tabacum*.

Было обнаружено, что сибирские штаммы корневой губки существенно различались по продукции фоманноксина. В среде НРК наиболее активным продуцентом оказался *H. abietinum* H-1, синтезирующий 55 мкг/мл фоманноксина. Его продукция у *H. abietinum* Hp-8, H-3 и H-4 была ниже и составила 11, 4 и 5 мкг/мл соответственно. *H. annosum* 45-2, H-2 и T-Ha синтезировали 16. 7 и 3 мкг/мл фоманноксина соответственно. У *H. annosum* K-Ha-4 и A-Ha-1 продукция фоманноксина отсутствовала, но они синтезировали метаболиты фоманноксинового ряда: 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид.

**Таблица 3.** Фитопатогенная активность сибирских штаммов *Heterobasidion* по отношению к проросткам *Pinus sylvestris*

| Вид, штамм | Продолжительность инкубирования, сут | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6 | | | 12 | | 18 | | |
| | жизнеспособность, % от контроля | длина стебля, мм | растения с некрозом, % | жизнеспособность, % от контроля | растения с некрозом, % | жизнеспособность, % от контроля | длина стебля, мм | растения с некрозом, % |
| *H. annosum* | | | | | | | | |
| **45-2** | 37.0 | 14.7 | 70.0 | **0.0** | **100.0** | | | |
| **A-Ha-1** | 55.6 | 20.5 | 45.3 | 20.3 | 85.1 | **0.0** | **–** | **100.0** |
| **K-Ha-4** | 60.1 | 22.7 | 41.3 | 30.2 | 81.3 | **0.0** | **–** | **100.0** |
| T-Ha | 69.4 | 25.8 | 34.9 | 54.1 | 75.1 | 32.1 | 30.1 | 94.0 |
| H2 | 70.4 | 26.3 | 32.1 | 59.3 | 72.9 | 36.7 | 31.8 | 93.0 |
| *H. abietinum* | | | | | | | | |
| H1 | 76.7 | 28.9 | 19.7 | 66.7 | 70.0 | 54.7 | 34.5 | 92.0 |
| H3 | 100.0 | 29.8 | 7.2 | 100.0 | 44.4 | 97.0 | 35.8 | 70.3 |
| Hp-8 | 70.4 | 29.3 | 20.1 | 59.3 | 72.9 | 46.7 | 30.8 | 97.0 |
| H4 | 74.1 | 32.6 | 5.3 | 66.7 | 77.8 | 58.8 | 37.5 | 91.0 |
| *H. ecrustosum* | | | | | | | | |
| He-16K | 100.0 | 45.8 | 0.0 | 100.0 | 4.4 | 100.0 | 55.8 | 7.4 |
| Контроль | 100.0 | 51.3 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 60.7 | 1.0 |

На трех штаммах было изучено влияние двух других по составу питательных сред на продукцию фоманноксина. Обнаружено, что у *H. abietinum* H-1 концентрация фоманноксина в органоминеральных средах **2** и **3** была в 2.2 и 4.2 раза ниже по сравнению со средой HPK. Наиболее благоприятной для биосинтеза фоманноксина *H. annosum* 45-2 была среда **3**, поскольку содержание фоманноксина в ней было в 2 раза выше по сравнению со средой HPK, при этом наблюдался также биосинтез фоманнозина. В средах **2** и **3** *H. abietinum* Hp-8 не синтезировал фоманноксин, но в них были идентифицированы другие метаболиты фоманноксинового ряда: (2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид.

Таким образом, биосинтез фоманноксина определялся физиолого-биохимическими особенностями исследуемых штаммов, при этом состав среды культивирования оказывал регуляторное влияние на биосинтез вторичных метаболитов фоманноксинового ряда. Отсутствие биосинтеза фоманноксина у *H. abietinum* Hp-8 в органоминеральных средах подтверждало, что его биосинтез определялся регуляцией генов биосинтетического пути в зависимости от условий культивирования.

Сравнение данных фитопатогенности и продукции фоманноксина штаммами показало, что высоко патогенный *H. annosum* 45-2 характеризовался высокой продукцией фоманноксина (16–32 мкг/мл) и широким спектром синтезированных метаболитов, обладающих фитотоксичными свойствами. У всех штаммов, проявляющих фитопатогенные свойства, были обнаружены вторичные метаболиты фоманоксинового ряда. Различия в степени патогенности и содержания фоманноксина связаны с совокупностью различных факторов, влияющих на эти процессы, например, с отличиями в условиях роста грибов *in vivo* и *in vitro*. Недавно было показано, что в процесс грибной инфекции *Heterobasidion* могут быть также вовлечены небольшие секретируемые белки [28]. Можно предположить, что фитопатогенностью обладают метаболиты, близкие по структуре к фоманноксину, что было показано для штаммов *H. annosum* K-Ha-4 и A-Ha-1. Эти метаболиты, так же, как и фоманноксин, содержат в структуре ароматическую карбонильную группу, которая, отвечает в основном за повреждающее действие на растительные клетки [29]. Отсутствие биосинтеза фоманноксина и других соединений этой группы у корейского штамма *H. ecrustosum* He-16K согласовывалось с наблюдениями в работе [30], что этот вид не проявляет патогенные свойства и является сапрофитом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Asiegbu F.O., Adomas A., Stenlid J.* // Mol. Plant Pathol. 2005. V. 6. № 4. P. 395–409.
2. *Garbelotto M., Gonthier P.* // Ann. Review Phytopathol. 2013. V. 51. P. 39–59.
3. *Федоров Н.И.* Корневые гнили хвойных пород. М.: Лесн. пром., 1984. 160 с.
4. *Василяускас А.П.* Корневая губка и устойчивость экосистем хвойных лесов. Вильнюс: Мокслас, 1989. 175 с.
5. *Стороженко В.Г., Иголкина Т.В.* // Лесное хозяйство. 1991. № 3. С. 47–50.

6. *Корхонен К.* Грибные сообщества лесных экосистем: материалы координационных исследований. Т. 2. / Ред. В.Г. Стороженко, В.И. Крутова. М.; Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2004. С. 89–113.
7. *Павлов И.Н., Барабанова О.А., Кулаков С.С., Юшкова Т.Ю., Агеев А.А., Пашенова Н.В., Тарасов П.А., Шевцов В.В., Иванова Т.Н.* // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. 27. № 3–4. С. 263–272.
8. *Павлов И.Н., Корхонен К., Губарев П.В., Черепнин В.Л., Барабанова О.А., Миронов А.Г., Агеев А.А.* // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. 25. № 1–2. С. 28–36.
9. *Pavlov I.N.* // Contem. Probl. Ecol. 2015. Т. 8. № 4. С. 440–456.
10. *Литовка Ю.А., Павлов И.Н.* Грибные сообщества лесных экосистем. Т. 5. / Ред. В.Г. Стороженко, А.В. Руоколайнен, А.В. Кикеева. М.; Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2018. С. 68–76.
11. *Hansson D., Menkis A., Olson E., Stenlid J., Broberg A., Karlsson K.* // Phytochemistry. 2012. V. 84. P. 31–39.
12. *Hansson D., Menkis A., Himmelstrand K., Thelander M., Olson E., Stenlid J., Karlsson M., Broberg A.* // Phytochemistry. 2012. V. 82. P. 158–165.
13. *Hansson D., Wubshet S., Olson A., Karlsson M., Staerk D., Broberg A.* // Phytochemistry. 2014. V. 108. P. 243–251.
14. *Gonzales-Ramirez M., Gavilan J., Silva-Grecchi T., Cajas-Madriaga D., Trivino S., Becerra J., Saez-Orellana F., Perez C., Fuentealba J.J.* // Alzheimer Disease. 2018. V. 61. № 4. P. 1463–1475.
15. Методы экспериментальной микологии / Ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
16. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
17. *Каюмов А.Р., Гимадутдинов О.А.* Практикум по молекулярной генетике. Казань: КФУ, 2016. 36 с.
18. *Sneath P.H.A., Sokal R.R.* Numerical Taxonomy: The principles and Methods of Numerical Classification. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. P. 18–24.
19. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
20. *Stenlid J.* // Can J. Bot. 1985. V. 63. № 12. P. 2268–2273.
21. *Horlacher N., Nachtigall J., Schulz D., Sussmuth R.D., Hampp R., Fiedler H.P., Schrey S.D.* // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. № 7. P. 931–941.
22. *Kepler J.A., Wall M.E., Mason J.E., Basset C., McPhail A.T., Sim G.A.* // J. Am. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 5. P. 1260–1261.
23. *Heslin M.C., Stuart M.R., Murchy P.O., Donnelly D.H.X.* // Eur. J. For. Path. 1983. V. 13. № 1. P. 11–13.
24. *Olson A., Lind M., Stenlid J.* // For. Path. 2005. V. 35. № 5. P. 321–331.
25. *Kimura M.* // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. № 2. P. 111–120.
26. *Felsenstein J.* // Evol. 1985. V. 39. № 4. P. 783–791.
27. *Hirotani M., O'Reilly J., Donnelly D.M.X.* // Tetrahedron Lett. 1977. V. 18. № 7. P. 651–652.
28. *Raffaello T., Asiegbu F.O.* // Sci Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 8000. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08010-0
29. *Zweimüller M., Antus S., Kovács T. Sonnenbichler J.* // Biol. Chem. 1997. V. 378. № 8. P. 915–921.
30. *Tokuda S., Hattori T., Dai Y., Ota Y., Buchanan P.K.* // Mycoscience. 2009. V. 50. № 3. P. 190e202.

# Secondary Metabolites of the Siberian Strains *Heterobasidion annosum* sensu lato

**T. V. Antipova[a], V. P. Zhelifonova[a], Yu. A. Litovka[b, c], I. N. Pavlov[b, c], B. P. Baskunov[a], A. A. Timofeev[b, d], and A. G. Kozlovsky[a, *]**

[a]*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, FRC Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*
[b]*Sukachev Institute of Forest, Siberaian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*
[c]*Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, 660049 Russia*
[d]*FRC "Krasnoyarsk Scientific Center" SB RAS, Krasnoyarsk, 660036 Russia*
**e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru*

Received September 29, 2019; revised October 15, 2019; accepted November 1, 2019

The composition of secondary metabolites of the basidiomycetes of the genus *Heterobasidion*, isolated in Central and Western Siberia, as well as in South Korea were studied. By morphological-cultural and molecular genetic methods, the studied cultures were assigned to the species *H. annosum* (Fr.) Bref. (5 strains), *H. abietinum* Niemelä & Korhonen (4 strains) and *H. ecrustosum* Tokuda, T. Hatt. & Y.C. Give (1 strain). In the metabolome profile of three *H. annosum* strains and all *H. abietinum* strains, fomannoxin prevailed. Two strains of *H. annosum* synthesized fomannoxin related compounds: 2-(2-hydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-carbaldehyde and 2-(2-hydroxypropan-2-yl)benzofuran-5-carbaldehyde. Fomannosine and its precursors were identified in *H. annosum* 45-2. It was shown that the composition of the fermentation medium influenced the number and composition of the synthesized metabolites. *In vitro* conditions, all studied strains of *H. annosum* and *H. abietinum* exhibited a phytopathogenic effect against seedlings of *Pinus sylvestris* L., causing necrotic damage to stems of various degrees and death of plants. Higher phytopathogenicity is characteristic of strains of *H. annosum*; maximal aggressiveness was observed in *H. annosum* 45-2 with the greatest diversity of compounds in the metabolome profile and active production of fomannoxin.

*Keywords: Heterobasidion annosum* sensu stricto, *Heterobasidion abietinum*, root rot, phytopathogenicity, fomannoxin, fomannosine

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 156–164

УДК 574;574.9;581.5613.1;631.46

# ВЛИЯНИЕ БЕЛОГО ФОСФОРА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ, ПРОТЕОМ И КЛЕТОЧНУЮ МОРФОЛОГИЮ *Aspergillus niger*

**© 2020 г. А. З. Миндубаев[1, *], С. В. Кузнецова[2], В. Г. Евтюгин[2], А. Г. Даминова[2], Т. В. Григорьева[2], Ю. Д. Романова[2], В. А. Романова[2], В. М. Бабаев[1], Д. Н. Бузюрова[1], Э. В. Бабынин[2], Е. К. Бадеева[1], С. Т. Минзанова[1], Л. Г. Миронова[1]**

[1]*Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, 420088 Россия*

[2]*"Казанский (Приволжский) федеральный университет", Казань, 420008 Россия*

**e-mail: mindubaev-az@yandex.ru*

Поступила в редакцию 21.06.2019 г.
После доработки 10.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

В работе исследовали механизмы устойчивости штаммов *Aspergillus niger* AM1 и AM2 к белому фосфору. Показано, что присутствие белого фосфора в концентрации 0.25% в среде мало влияло на соотношение живых и мертвых клеток при выращивании грибов, то есть устойчивость к токсиканту у грибов была достаточно высока. Методами электронной микроскопии установлено увеличение толщины клеточной стенки гриба, барьера на пути проникновения белого фосфора в клетку. Методом MALDI показан биосинтез новых белков-ферментов, которые могли участвовать в обезвреживании белого фосфора. Помимо этого, белый фосфор вызывал активацию метаболизма, сопровождающуюся ростом числа митохондрий в клетках.

*Ключевые слова:* биодеградация, белый фосфор, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия, протеомный анализ, масс-спектрометрия, *Aspergillus niger*

**DOI:** 10.31857/S0555109920020117

Белый фосфор $P_4$ – один из самых опасных загрязнителей окружающей среды [1]. Вместе с тем, $P_4$ широко применяется в промышленности и при производстве лекарств, фосфорных удобрений, полимеров и ряда других важнейших веществ и материалов [2], что может приводить распространению этого токсиканта в окружающей среде. Протокол III к "Конвенции о конкретных видах обычного оружия" 1980 г. запрещает использование $P_4$ в военных целях. Однако запрет постоянно нарушается, что влечет за собой человеческие жертвы и значительное загрязнение окружающей среды. Эффективные методы очистки природных сред от этого загрязнителя до сих пор не созданы [3].

В то же время, фосфор обладает уникальными качествами: высокой токсичностью в виде простого вещества ($P_4$) и свойствами биогенного элемента, абсолютно необходимого всем живым организмам, в окисленном состоянии [4]. Чтобы найти эффективный и экологически безвредный способ окисления белого фосфора до фосфата, было предложено использование активных микроорганизмов, способных расти в присутствии этого токсиканта.

В настоящее время биодеградация – часто применяемый на практике метод для обезвреживания промышленных стоков, обогащенных неприродными веществами самых разнообразных классов, в том числе токсичных соединений [5, 6]. При биодеградации микроорганизмы осуществляют деструкцию ксенобиотиков, в результате чего они не попадают в окружающую среду . Известны способы биодеградации некоторых токсичных соединений фосфора, которые применяются на практике [7], однако для белого фосфора таких данных в литературе не найдено.

Ранее было показано, что микроорганизмы способны выживать при контакте с белым фосфором, адаптируясь к его присутствию в среде, превращая его при этом в менее токсичные соединения – кислородсодержащие соединения фосфора [8, 9].

Исследование биохимических механизмов устойчивости микроорганизмов к белому фосфору важно для разработки технологии его обезвреживания, выяснения влияния $P_4$ на микробный метаболизм, развитие адаптивных реакций и возможности его использования микроорганизмами в качестве биогенного элемента.

Цель работы – структурно-морфологические и протеомные исследования грибов *Aspergillus niger* AM1 и AM2, способных обезвреживать белый фосфор.

## МЕТОДИКА

**Подготовка проб.** Для протеомного анализа споры грибов с поверхности агаризованной среды *Aspergillus niger* AM1 и AM2 [10] переносили в пробирки с 4 мл среды, следующего состава (г/л): NaCl – 2.5, $MgSO_4$ – 0.5, $KNO_3$ – 2.0, глюкоза – 8.0. В четырех пробирках в качестве источника фосфора использовали фосфаты (контроль), а в четырех других 0.25%-ную эмульсию белого фосфора (опыт). В контрольную среду в качестве источника фосфора вносили (г/л) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 7.4, $KH_2PO_4$ – 2.38. Пробирки инкубировали 4 сут при 25°C до получения плотного мицелия на поверхности жидкой среды.

Белый фосфор в опыте был единственным источникам фосфора и вносился перед посевом. Эмульсию белого фосфора готовили следующим образом: 1 г белого фосфора $P_4$ диспергировали в 50 мл (концентрация 2%) стерильного физиологического раствора в ультразвуковой ванне "Сапфир" (Россия) 30 мин при 50°C. Концентрацию белого фосфора в среде рассчитывали после культивирования методом ЯМР, как описано ранее [11].

Описанную выше схему посева и культивирования использовали также при при микроскопическом исследовании мицелия.

**Конфокальная микроскопия.** Для проведения конфокальной микроскопии посев *Aspergillus niger* AM1 и AM2 проводили в шестилуночные планшеты, с жидкой средой, описанной выше. Мицелий извлекали из лунок планшета, переносили в пробирки Эппендорфа, окрашивали флуоресцентными красителями. и исследовали методом конфокальной микроскопии между покровными стеклами с использованием лазерного конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 780 ("Carl Zeiss", Германия).

Для определения жизнеспособности грибных гиф в контрольном и опытном образцах двух штаммов использовали коммерческий набор красителей LIVE/DEAD®BacLightTM ("Thermo Fisher Scientific", США). Мицелий окрашивали смесью красителей пропидиум йодид и SYTO 9 ("Thermo Fisher Scientific", США), флуоресцирующих при разных длинах волн. Для этих красителей длины возбуждения и эмиссии 480/500 нм(SYTO 9) и 490/635 нм (пропидиум йодид) [12]. Интенсивность флуоресценции оценивалась при помощи программы ZEN 3.0 (ZEN lite), разработанной на фирме "Carl Zeiss", позволяющей сравнивать на фотографиях количество пикселей интересующих цветов.

**Электронная микроскопия.** Для проведения электронной микроскопии мицелий гриба выращивали также в шестилуночных планшетах на описанной выше среде. Отобранный из лунок мицелий, промывали фосфатным буфером 3 раза и фиксировали по стандартному протоколу, основанному на обезвоживания и полимеризации материала в смоле Epon 812, как описано в работе [13].

Мицелий *Aspergillus niger* контрольного и опытного образцов двух штаммов фиксировали 12 ч в 1%-ном растворе глутарового альдегида, приготовленного на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.2. Далее фиксированные образцы переносили в 2.5%-ный раствор глутарового альдегида на 2 ч. Фиксацию проводили в 1%-ном растворе $OsO_4$ с добавлением 25 мг/мл сахарозы в течение 2 ч. Образцы обезвоживали последовательно в серии растворов с увеличивающейся концентрацией этилового спирта, затем в окиси пропилена, после чего последовательно пропитывали в течение 24 ч эпоксидной смолой Epon 812 ("Fluka", Швейцария) и окисью пропилена в соотношениях: 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1.

Затем образцы помещали в чистую смолу и поэтапно проводили полимеризацию при температурах 37, 45 и 60°C, каждый этап в течение 24 ч. После фиксации, в соответствии с протоколом для электронной микроскопии, ультратонкие срезы клеток получали на микротоме Leica UC7 ("Leica", Германия) и помещали на 3 мм медные сеточки и окрашивали 20 мин насыщенным водным раствором уранилацетата, а затем 5 мин цитратом свинца как описано в работе [14]. Срезы просматривали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT 7700 Exalens ("Hitachi", Япония) при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0.144 нм.

**Разделение и анализ белков.** Для извлечения белков из мицелия *Aspergillus niger* использовали метод экстракции, описанный ранее в статье [15], с некоторыми изменениями. Другие методы экстракции белка не подходили, так как для необходимо было разрушение содержащей хитин клеточной стенки гриба.

Для извлечения белков биомассу предварительно промывали водой и растирали в ступке с жидким азотом. Навеску мицелия массой 50 мг переносили в чистую микропробирку и добавляли 400 мкл 0.5 М Трис-HCl (pH 8.3), 2%-ный вес/об. 3 – ((3-холамидопропил) диметиламмонио)-1-пропансульфонат, 20 мМ MgCl 2%-ный вес/об. дитиотреитол, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид; 2.5% об./об. октилфенокси-поли(этиленокси)этанол. К раствору добавляли шарики из оксида циркония диаметром 0.1 и 0.5 мм для разрушения на гомогенизаторе "Fast Prep"( "MP Biomedicals", США) в течение 30 с, с охлаждением на льду в течение 2 мин между повторами. Общее время гомогенизации составляло 3 мин. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 12000 g и 4°C. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку, белки из раствора осаждали добавлением 4 об. холодного раствора 10%-ной трихлоруксусной кис-

лоты в ацетоне с 0.007% дитиотреитола. Образцы инкубировали на льду в течение 30 мин, а затем центрифугировали при 5000 g 20 мин и 4°C. Осадок промывали от трихлоруксусной кислоты охлажденным раствором 0.007%-ного дитиотреитола в ацетоне трижды. После чего осадок белков подсушивали 10 мин при комнатной температуре и перерастворяли в 50 мкл буфера, следующего состава: 7 М мочевина, 2 М тиомочевина, 3%-ный вес/об. 3 – ((3-холамидопропил) диметиламмонио)-1-пропансульфонат, 2%-ный вес/об. нонилфеноксиполиэтоксилэтанол, 10 мМ Трис–HCl, pH 8.5.

Концентрацию белка в растворе определяли модифицированным методом Лоури с бицинхониновой кислотой [16].

После определения концентрации белка отбирали аликвоты образцов так, чтобы в пробе содержалось по 150 мкг белка. Белки в пробах окрашивали 3 мкл 2 мМ раствора флуоресцентных красителей Cy3 или Cy5 (“Lumiprobe”, Россия) в диметилформамиде в течение 1 ч на льду в темноте, согласно инструкции производителя. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл 10 мМ раствора лизина. Затем смешивали контрольный (выращенный в среде с фосфатом) и опытный (выращенный в среде с белым фосфором) образцы, доводили объем смеси до 300 мкл растворителем белка, следующего состава: 8 М мочевина, 3%-ный вес/об. 3 – ((3-холамидопропил) диметиламмонио)-1-пропансульфонат, 2%-ный вес/об. нонил феноксиполиэтоксилэтанол, 0.2% амфолитов с pH 3-10 (“GE Healthcare”, Швейцария), 50 мМ дитиотреитол, 10 мМ HCl, pH 8.5.

Далее проводили изоэлектрофокусирование белков на коммерческих IPG (immobilized pH gradient) -стрипах (“Bio-Rad”, 17 см, pH 3–10). Полученную смесь в объеме 300 мкл наносили на IPG стрип и проводили активную регидратацию под напряжением (13 ч), а затем 8 ч изоэлектрофокусирование на приборе “Protean i12 IEF cell” (“Bio-Rad”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. После изоэлектрофокусировки стрипы инкубировали 10 мин в растворе, следующего состава: 6 М мочевина, 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 30%-ный глицерин, 2%-ный додецилсульфат натрия и 30 мМ дитиотреитол, а затем еще 10 мин в растворе, содержащем 6 М мочевину, 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 30%-ный глицерина, 2%-ный додецилсульфат натрия и 5%-ный йодацетамид. После изоэлектрофокусировки отмытый IPG-стрип использовали для разделения белков по массе методом электрофореза в градиентном полиакриламидном геле от 9 до 16% акриламида (20 × 18 см) в денатурирующих условиях в течение 5 ч при 10°C. Программа источника напряжения на 1 гель: 20 мин – 20 мА, 3 ч – 40 мА, 2 ч – 35 мА. Гели фиксировали в растворе 20%-ного изопропанола и 10%-ной уксусной кислоты.

Флуоресцентно окрашенные белковые пятна визуализировали с помощью высокоразрешающего лазерного сканера гелей “Typhoon FLA 9500” (“GE Healthcare”, Швейцария). Изображения гелей с флуоресцетно-окрашенными белковыми пятнами анализировали в программе ImageQuant (“GE Healthcare”, Швейцария), сравнивая интенсивность сигналов красок Cy3 и Cy5 одних и тех же белков. Изображения гелей сохраняли в электронном формате и использовали в качестве разметки для последующих этапов.

На следующем этапе работы все гели были окрашены серебром по стандартной методике, как описано в работе [17]. После чего из гелей было вырезано 30 белковых точек, интенсивности сигналов которых отличались от контроля (белковый профиль гриба, выращенного в среде с фосфатом). Вырезанные кусочки гелей с белком были отмыты от серебра раствором 30 мМ ферроцианид калия и 100 мМ раствора тиосульфата натрия. Гидролиз белков проводили с использованием трипсина (“Promega”, США), который добавляли к гелю в количестве 0.1 мкг в 5 мкл 50 мМ аммоний-бикарбонатного буфера. Инкубацию проводили при 37°C в течении 16 ч, реакцию останавливали добавлением 5 мкл 0.1%-ной трифторуксусной кислоты (**ТФУ**). Экстракцию полученных пептидов проводили на ультразвуковой бане. Полученные экстракты высушивали на центрифужном концентраторе “Concentrator plus” (“Eppendorf”, Германия) при 45°C.

**Масс-спектрометрия пептидов.** Пептиды растворяли в 0.1%-ном растворе ТФУ в воде. Масс-спектры получали на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия), оснащенном лазером Nd:YAG ($\lambda = 355$ нм, частота 100 Гц), в режиме рефлектрона с регистрацией положительно заряженных ионов. Масс-спектр был получен с ускоряющим напряжением 25 кВ и временем задержки экстракции ионов 30 нс. Итоговый масс-спектр был сформирован за счет 50-кратного облучения кристалла лазером. Использовалась металлическая мишень MTP (target plate ground steel). На мишень последовательно наносили и упаривали 0.5 мкл полунасыщенного раствора матрицы (2.5-дигидроксибензойная кислота ) в смеси ацетонитрил–0.1%-ный водный раствор ТФУ 7 : 3 об. и 2 мкл раствора образца в 0.1%-ном водном растворе ТФУ. После полного высушивания получали спектры пептидов в диапазоне от 700 до 3500 Да. Внутреннюю калибровку спектров проводили по пикам пептидов – продуктов автолиза (самогидролиза) трипсина. Для построения масс-листов использовали моноизотопные массы, идентификацию белков проводили с помощью программы MASCOT против базы данных *Aspergillus*, которая включает в себя нуклео-

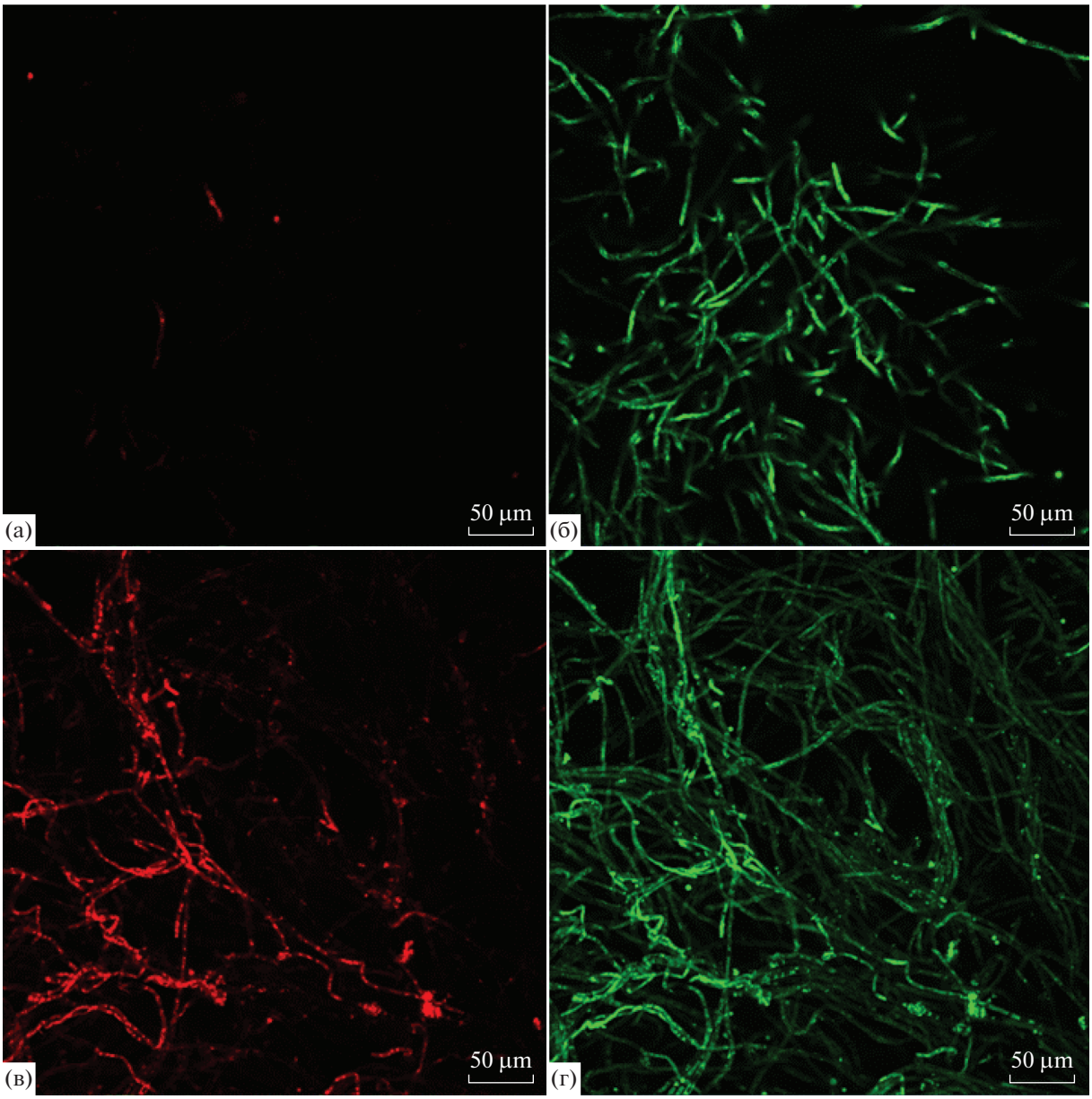


**Рис. 1.** Изображения мицелия *A. niger* AM1, выросшего на среде с фосфатом (контроль, а, б), и на среде с белым фосфором (в, г), окрашенного пропидиум йодидом (а, в, мертвый мицелий, красная флуоресценция) и SYTO 9 (б, г, живые клетки, зеленая флуоресценция).

тидные последовательности рода *Aspergillus*. В параметрах поиска указывали 1 возможный пропущенный сайт трипсинолиза, ошибка MS –0.3 Да, вероятная модификация – окисление метионина.

Данные были получены с помощью программы FlexControl (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия) и обработаны с помощью программы FlexAnalysis 3.0 (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения влияния белого фосфора на жизнеспособность клеток грибов *A. niger* AM1 и AM2 использовали метод конфокальной микроскопии. После обработки флуоресцентными красителями жизнеспособные гифы окрашивались в зеленый цвет, а мертвые – в красный. Можно было предположить, что в присутствии токсичного вещества соотношение количества мертвых клеток к живым будет выше по сравнению с контролем. Однако как показали результаты, это соотношение мало зависело от присутствия белого фосфора в среде. У штамма AM1 в контроле (рис. 1а, 1б) интенсивность красной флуоресценции составила 17.620 ед. (рис. 1а), а зеленой 27.493 (рис. 1б). В опыте у AM1 (рис. 1в, 1г) эти величины составили 24.707 (рис. 1в) и 34.022 соответственно (рис. 1г). Для штамма AM2 в контроле интенсивность красной

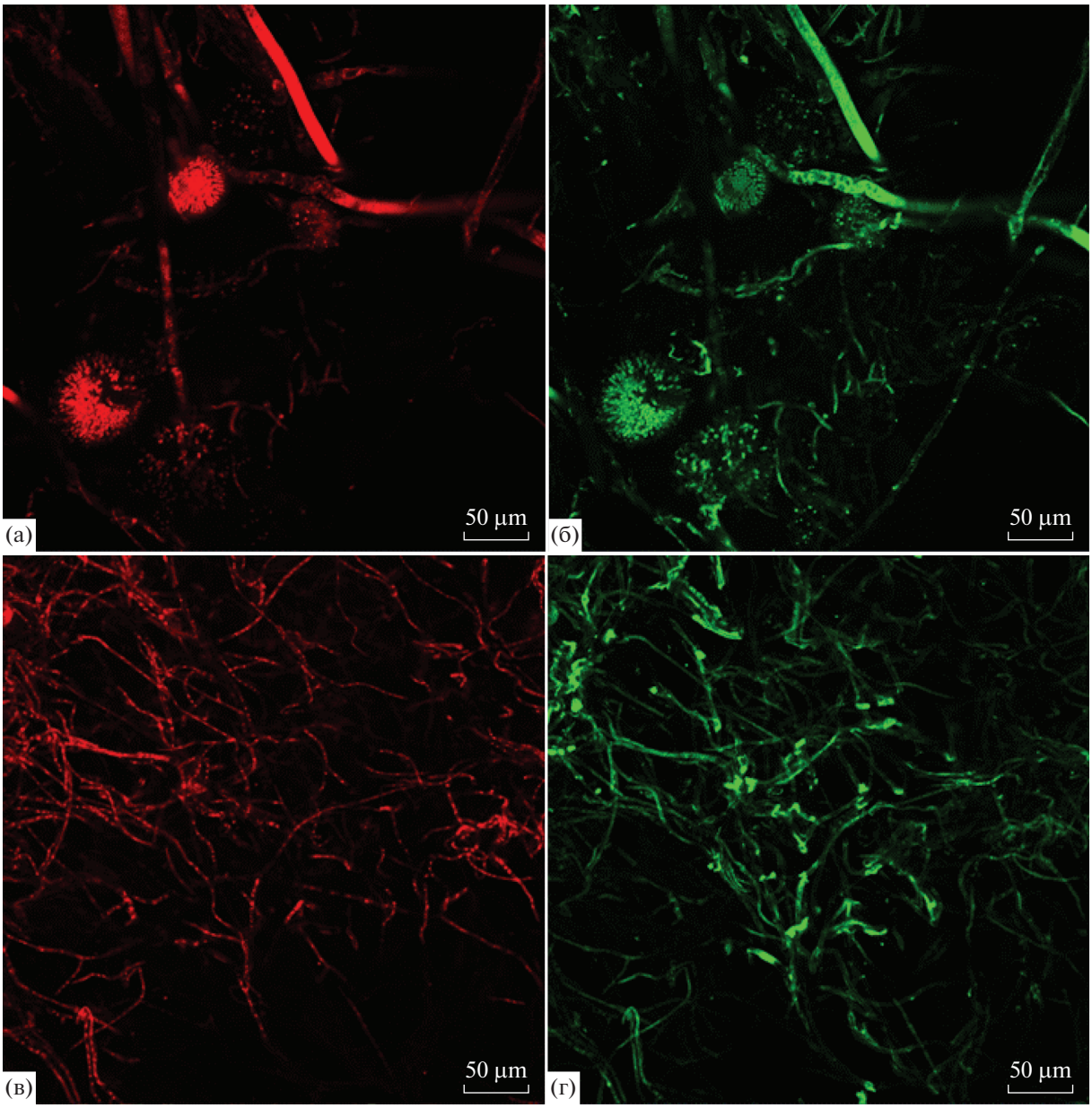


**Рис. 2.** Изображения мицелия *A. niger* AM2, выросшего на среде с фосфатом (контроль, а, б) и на среде с белым фосфором (в, г), окрашенного пропидиум йодидом (а, в, мертвый мицелий – красная флуоресценция) и SYTO 9 (б, г, живые клетки – зеленая флуоресценция).

флуоресценции составила 24.172, зеленой 26.980 (рис. 2а, 2б), а в опыте 26.855 и 27.589 (рис. 2в, 2г) соответственно. То есть, как в контроле так и в присутствии $P_4$ у обоих исследуемых штаммов *A. niger* живые клетки преобладали над мертвыми. Таким образом, белый фосфор в исследуемой концентрации (0.25%) оказывал на выживаемость мицелия гриба незначительное влияние.

Исследование поперечных срезов клеток мицелия в электронном микроскопе показало, что клетки контрольного образца гриба имели электронноплотную цитоплазму с хорошо выявляемыми органеллами: митохондрии с кристами, шероховатый эндоплазматический ретикулум с рибосомами, вакуоли с электронно-прозрачным содержимым. На продольных септах и поперечных срезах гиф хорошо видна клеточная стенка гриба. Цитоплазматическая мембрана имела целостную структуру, без разрывов и повреждений. Также у части клеток наблюдались электронноплотные включения запасных веществ (рис. 3). При воздействии белого фосфора наблюдалось увеличение плотности и толщины клеточной стенки (с 2.5–3 мкм в контроле до 5 мкм в опыте).

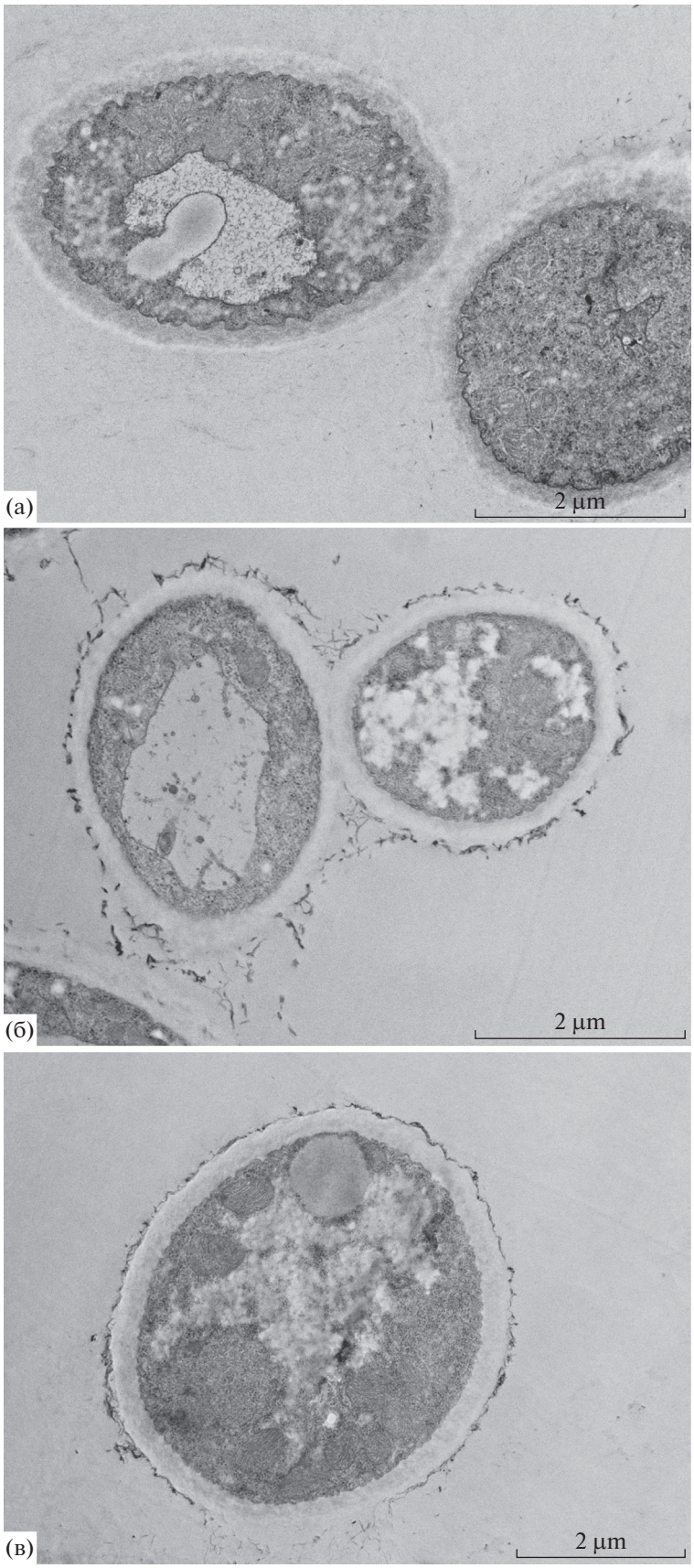


**Рис. 3.** ТЭМ изображение поперечного среза мицелия *A. niger* AM1(а) и AM2(б), выращенных в среде с фосфатом и AM1, выращенного в среде с белым фосфором (в).

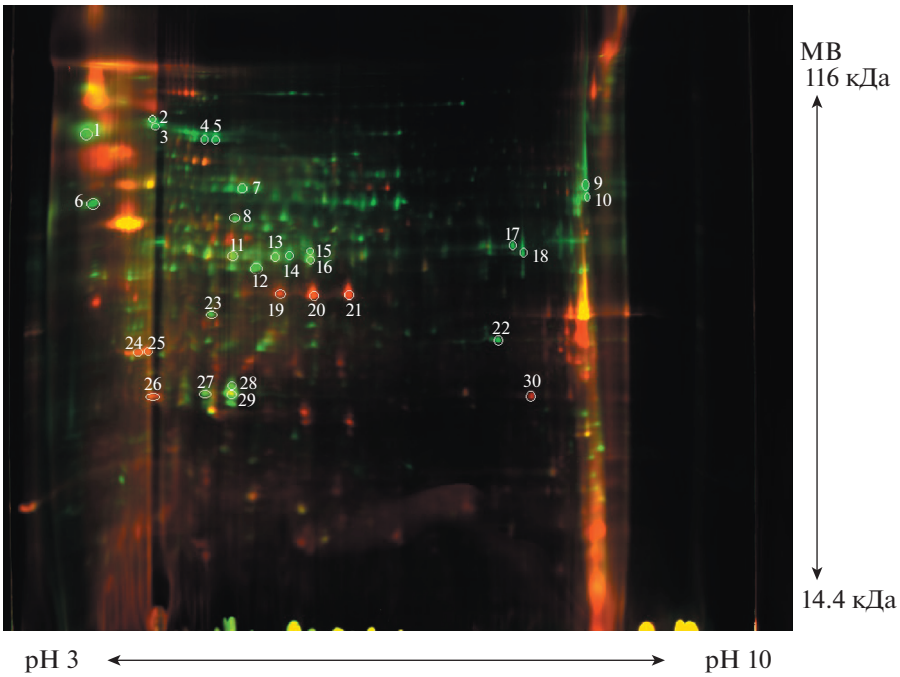


**Рис. 4.** Сканированное изображение двумерного электрофореза протеома *Aspergillus niger*. Белки, экстрагированные из мицелия, выращенного на среде с фосфатами (контроль) окрашены красным, белки мицелия, выращенного на среде белым фосфором, – зеленым. Желтая флуоресценция – результат наложении белков контроля и опыта. Белыми кругами отмечены вырезанные для идентификации пятна белков.

Также значительно увеличивалось количество митохондрий в клетках гиф (рис. 3в), а на поверхности клеточной стенки появлялся дополнительный волокнистый слой, состоящий из протеогликанов [18]. При этом поверхность гиф становилась ворсистой, чего не наблюдалось в контроле (рис. 3а). В структуре клеточного содержимого изменений выявлено не было, никаких разрушений органелл, нарушений в структуре цитоплазматической мембраны и цитоплазме не наблюдалось.

Следует отметить, что штамм *A. niger* AM2 оказался более адаптированным к росту в присутствии белого фосфора по сравнению с исходным AM1 [19], так как имел утолщенную клеточную стенку и развитый волокнистый слой даже в контроле при отсутствии белого фосфора в среде (рис. 3б). Штамм был отобран по признаку устойчивости к воздействию этого токсиканта, поэтому, вероятно такая структура поверхностности грибной клетки стала для отобранного штамма AM2 его характерной морфологической осбенностью.

Исследования протеома *A. niger* AM2 и AM1 продемонстрировало некоторые различия в экспрессии генов и белковых профилях экстракта мицелия при выращивании гриба в отсутствии и присутствии белого фосфора. На рис. 4 представлены белковые профили в контрольном и опытном образцах после проведения двумерного электрофореза. После получения MALDI-спектров и обработки данных были идентифицированы белки № 6, 9 и 22, соответственно нумерации пятен белков на геле.

Белок № 6 – дигидронеоптеринальдолаза, участвующая в биосинтезе фолиевой кислоты и близких к ней птериновых коферментов. Вероятно, их присутствие стимулировало метаболические процессы и способствовало детоксикации белого фосфора и его токсичных производных [20, 21]. Белок № 9 – оксидоредуктаза, возможно, принимающая участие в окислении белого фосфора и его производных [22]. Белок № 22 оказался белком с неизвестной функцией. Его появление в ответ на действие белого фосфора дает основание предполагать, что, возможно, данный белок может участвовать в защите от стрессовых воздействий. Например, он может оказаться ферментом, участвующем в обезвреживании белого фосфора, или его транспорте внутрь клетки, а также одним из белков, инициирующих каскадный механизм реакции на стресс.

В предыдущих работах было показано, что все изучаемые штаммы *A. niger* обладали устойчивостью к $P_4$ и были способны использовать это вещество в качестве источника фосфора [23]. Следовательно эти штаммы имели защитные механизмы, позволявшие им проявлять устойчивость к этому токсичному загрязнителю окружающей

среды. Устойчивость бактерий к присутствию в среде этого токсиканта была значительно ниже [23], по сравнению со штаммами *A. niger* AM1. Возможно, большая устойчивость гриба была связана с его морфологическими особенностями, в первую очередь со строением клеточной стенки. Дальнейшие исследования с применением оптической и электронной микроскопией подтвердили данное предположение.

Конфокальная микроскопия показала, что белый фосфор в исследуемой концентрации (0.25%) оказывал незначительное влияние на жизнеспособность мицелия гриба. Электронная микроскопия продемонстрировала утолщение клеточных стенок гриба при его выращивании в присутствии белого фосфора, увеличение ее плотности, а также появление на наружной поверхности волокнистого слоя и увеличение числа митохондрий в гифах. Данные признаки, по-видимому, были связаны с защитой от внешних воздействий: клеточная стенка служит барьером, а митохондрии осуществляют энергетический обмен, поддерживая метаболическую активность. У адаптированного к присутствию белого фосфора штамма *A. niger* AM2 эти признаки проявлялись постоянно, в том числе и в контроле.

Методом MALDI была показана существенная разница в генной экспрессии у грибов в контроле и опыте (в присутствии белого фосфора). Отмечено появление новых белков, не характерных для грибов этого вида. Один из белков обладал неизвестной функцией.

Представленная работа открывает возможность создания биологических методов обезвреживания белого фосфора. Помимо этого, в работе применены современные подходы к исследованию адаптации микроорганизмов к новым веществам, обладающим высокой токсичностью.

Авторы выражают благодарность Фонду содействия инновациям за финансовую поддержку проекта № 39113 (заявка № С1-34299).

Лазерная конфокальная микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия проводились на базе Междисциплинарного центра “Аналитическая микроскопия” КФУ. Масс-спектрометрические исследования проведены в ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff W., Thampi S., Donkin S.* Toxicological Profile for White Phosphorus. U.S. Department of Health and Human Services. USA. 1997. 248 p.
2. *Gleason W.* // JOM. 2007. V. 59. № 6. P. 17–19.
3. *Walsh M.E., Collins C.M., Racine C.* Persistence of White Phosphorus Particles in Sediment / US Army Cold Regions Research and Engineering Lab Hanover New Hampshire 1995. 51 p.
4. *Cummins C.C.* // Daedalus. 2014. V. 143. №.4. P. 9–20.
5. *Хоменков В.Г., Шевелев А.Б., Жуков В.Г., Загустина Н.А., Безбородов А.М., Попов В.О.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 133–152.
6. *Миндубаев А.З.* // Экологический вестник Северного Кавказа. 2018. Т. 14. № 1. С. 11–23.
7. *Singh B.K., Walker A.* // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. № 3. P. 428–471.
8. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Яхваров Д.Г.* // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22. № 1. С. 33–37.
9. *Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д.* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. № 1. С. 81–94.
10. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Акосах Й.А.* // Экологический вестник Северного Кавказа. 2019. Т. 15. № 1. С. 51–57.
11. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Яхваров Д.Г.* // Российский журн. прикладной экологии. 2018. Т. 1. № 13. С. 28–32.
12. *Gorshkov V., Petrova O., Gogoleva N., Gogolev Y.* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. V. 59. № 3. P. 378–385.
13. *Бисерова Н.М.* Методы визуализации биологических ультраструктур. Практическое руководство для биологов. Москва: Издательство КМК, 2013. 110 с.
14. *Reynolds E.S.* // J. Cell Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208–212.
15. *Bhadauria V., Peng Y.-L.* // Indian J. Microbiol. 2010. V. 50. № 1. P. S127–S131.
16. The Protein Protocols Handbook: Second Edition. / Ed. J.M. Walker. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002. P. 11–14.
17. *Lelong C., Chevallet M., Luche S., Rabilloud T.* // Methods Mol. Biol. 2009. V. 519. P. 339–350.
18. *Kang X., Kirui A., Muszyński A., Widanage M.C.D., Chen A., Azadi P., Wang P., Mentink-Vigier F., Wang T.* // Nat.Commun. 2018. V. 9. №. 2747. P. 1–12.
19. *Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Хаяров Х.Р., Сахапов И.Ф., Бадеева Е.К., Стробыкина А.С., Валидов Ш.З., Бабаев В.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г.* // Бутлеровские сообщения. 2017. Т. 51. № 8. С. 1–26.
20. *Adams N.E., Thiaville J.J., Proestos J., Juárez-Vázquez A.L., McCoy A.J., Barona-Gómez F., Iwata-Reuyl D., de Crécy-Lagard V., Maurelli A.T.* // MBio. 2014. V. 5. № 4. e01378-14. P. 1–14.
21. *Maita N., Okada K., Hatakeyama K., Hakoshima T.* // PNAS. 2002 . V. 99. № 3. P. 1212–1217.
22. *Harriff M.J., Danelishvili L., Wu M., Wilder C., McNamara M., Kent M.L., Bermudez L.E.* // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 4. P. 1132–1142.
23. *Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Кабирова Г.К., Синицина А.А., Шайхутдинов Р.К.-У., Шарипов А.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А.* // Бутлеровские сообщения. 2018. Т. 56. № 11. С. 1–24.

# The Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology and Proteome of *Aspergillus niger*

**A. Z. Mindubaev[a, *], S. V. Kuznetsova[b], V. G. Evtyugin[b], A. G. Daminova[b], T. V. Grigoryeva[b], Y. D. Romanova[b], V. A. Romanova[b], V. M. Babaev[a], D. N. Buzyurova[a], E. V. Babynin[b], E. K. Badeeva[a], S. T. Minzanova[a], and L. G. Mironova[a]**

[a]*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan, FRC Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420088 Russia*

[b]*Kazan (Volga region) Federal university, Kazan, 420008 Russia*

**e-mail: mindubaev-az@yandex.ru*

Received June 21, 2019; revised October 10, 2019; accepted November 1, 2019

In the present study, the resistance mechanisms of *Aspergillus niger* AM1 and AM2 to white phosphorus were studied. It was shown that the presence of white phosphorus ($P_4$) at a concentration of 0.25% in the medium had a marginal impact on the ratio of living to dead cells during the cultivation of fungi, inferring a high resistance of the strains to $P_4$. Observations made using electron microscopy, showed an increase in the thickness of fungal cell wall, being a barrier to the penetration of white phosphorus. MALDI results divulged the biosynthesis of new protein enzymes that could potentially participate in the neutralization of white phosphorus. In addition, white phosphorus caused the activation of metabolism, accompanied by an increase in the number of mitochondria in the cells.

*Keywords:* biodegradation, white phosphorus, confocal microscopy, electron microscopy, proteomic analysis, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, *Aspergillus niger*

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 165–173

УДК 579.22:577.13:633.358

# ИЗУЧЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ N-ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА БАКТЕРИЯМИ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*

**© 2020 г. Л. Е. Макарова[1, *], А. С. Мориц[1], Н. А. Соколова[1], И. Г. Петрова[1], А. А. Семенов[1], Л. В. Дударева[1], М. С. Третьякова[1], А. В. Сидоров[1, 2]**

[1]*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия*

[2] *Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, Иркутск, 664003 Россия*

**e-mail: makarova@sifibr.irk.ru*

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.
После доработки 27.08.2019 г.
Принята к публикации 30.08.2019 г.

Изучен состав ароматических соединений в жидкой культуральной среде и в клетках бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae, Pseudomonas syringae* pv. *pisi, Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus,* выращенных в присутствии негативного аллелопатического соединения N-фенил-2-нафтиламина (**N-ФНА**), обнаруженного в корневых экссудатах бобовых культур. Показано, что основные продукты его деградации N-ФНА – фталаты. Бактерии могут активно секретировать их во внешнюю среду и преобразовывать одни виды фталатов в другие путем изменения в их молекулах алкильных группировок, связанных эфирной связью с *о*-фталевой кислотой. Исследуемые бактерии различались по скорости деградации N-ФНА (10 и 100 мкМ), который по разному влиял на их жизнеспособность и рост. Предложены возможные механизмы регуляции состава бактерий и их численности в ризосфере бобовых растений N-ФНА и фталатами, секретируемыми корнями в экссудаты, а также фталатами, образовавшимися при деградации N-ФНА в клетках бактерий.

*Ключевые слова: Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *Sepedonicus*, N-фенил-2-нафтиламин, фталаты, деградация

**DOI:** 10.31857/S0555109920010122

По современным представлениям регуляция растительно-микробных взаимоотношений и регуляция межвидового взаимодействия микроорганизмов в ризосфере растения осуществляются при участии секретируемых растением во внешнюю среду различных по структуре соединений, включая ароматические компоненты растительных экссудатов [1–4]. Механизмы этой регуляции с участием ароматических соединений растительного происхождения до сих пор недостаточно изучены, но как полагают, их функции в растительной ризосфере многообразны [2–5].

Среди ароматических соединений, с которыми можно связывать негативную регуляцию растительно-микробных взаимодействий особый интерес могут вызывать вещества, которые накапливаются в биосфере и имеют одновременно техногенное и биотическое происхождение. К числу таких соединений относятся N-фенил-2-нафтиламин (**N-ФНА**) и фталаты, которые в настоящее время причислены к опасным для живых организмов веществам [6–10].

N-ФНА относят к алкалоидам необычного строения [11, 12]. Данное соединение производится предприятиями химической промышленности и находит применение в производстве красителей и других органических химических веществ, в качестве антиокислителя резины, полимеров, в смазках, а также в смазочных и трансформаторных маслах, используется в качестве стабилизатора в электроизоляционных эмалях. Биотическое происхождение этого соединения доказано наличием его в тканях нескольких видов наземных и у двух представителей водных растений [12–18]. При этом у некоторых из этих растений N-ФНА нашли в составе компонентов корневых экссудатов [17, 18]. Данные о биосинтезе N-ФНА в клетках растений и микроорганизмов в литературе в настоящее время отсутствуют. Для оценки роли N-ФНА в ризосфере растения следует обратиться к результатам работ [18–20], доказывающих его негативный эффект на рост ризосферных бактерий.

Имеющиеся в настоящее время в литературе данные [21–23] указывают на существенные различия путей деструкции N-ФНА в клетках животных и бактерий. У бактерий при деструкции N-ФНА, по-видимому, основными конечными продуктами являются фталаты [23].

Фталаты попали в поле зрения исследователей с начала 70-х гг. 20-го столетия, когда обнаружилось накопление данных соединений в окружающей среде в связи с их широким применением в химической промышленности: в производстве пластмасс в качестве пластификаторов, для получения косметических средств и др. [24]. В клетках бактерий были выявлены фталаты, установлены основные пути биодеструкции этих соединений [26], определены предшественники их образования – полициклические ароматические углеводороды (**ПАУ**) [25–27]. Один из двух путей биодеградация ПАУ, приводящий к образованию *о*-фталевой кислоты, чаще всего выявляли у представителей таких родов бактерий, как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Micrococcus, Burkholderia* [27–30]. Результаты исследований более поздних исследований указывают на самостоятельный биосинтез фталатов в клетках некоторых видов бактерий [31, 32]. Этот путь биосинтеза фталатов у бактерий пока не исследован, но в бактериальных клетках имеются возможности для синтеза бензольного кольца из углеводов по шикимовокислотному пути [33].

Фталаты в тканях растений, а также в составе их корневых экссудатов обнаружены сравнительно недавно [18, 34, 35]. Результаты исследований [18, 31, 36, 37] раскрывают действие фталатов, секретируемых в ризосфере растений, в качестве ингибиторов роста бактерий. Степень негативного воздействия фталатов на клетки бактерий, очевидно, определяется не только их концентрацией в среде, но и видом алкильных группировок в их молекулах, которые соединены эфирной связью с *о*-фталевой кислотой, а также видом бактерий, подвергающихся их действию [31, 37]. В некоторых случаях причину подавления и даже гибели бактериальных клеток связывали с накоплением в них *о*-фталевой кислоты, как конечного продукта при деградации полициклических соединений [38]. Возможно, это происходит из-за нарушения этерификации *о*-фталевой кислоты, приводящей к образованию фталатов. Стимулирование роста бактерий фталатами возможно при наличии в клетках ферментных систем, позволяющих высвобождать из эфиров *о*-фталевую кислоту и далее метаболизировать ее с подключением β-кетоадипатного пути расщепления бензольного кольца до образования интермедиатов цикла Кребса [26, 28, 39].

Результаты приведенных выше работ позволяют предположить, что N-ФНА и фталаты в ризосфере секретирующих их растений, могут иметь большое значение в регуляции концентрации бактерий и их агрегации в виде биопленок на поверхности корней, а также в поддержании видового состава бактерий в ризомикробиоте. Механизмы этой регуляции, вероятно, связаны со скоростью деградации N-ФНА и чувствительностью к действию образующихся при этом фталатов. Возникающие под действием абиотических факторов изменения в составе фталатов, секретируемых растением [42], также могут влиять на ризосферные бактерии. Возможности для негативного влияния N-ФНА на метаболомную систему бактерий обусловлены легким проникновением его в клетки, вследствие высокой степени липофильности [8] и высокой антиоксидантой активности [23].

Цель работы – исследование состава продуктов деградации N-ФНА в ризосфере растений и их влияния на рост и жизнеспособность бактерий.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследований.** В экспериментах использовали бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rhiz), штамм 245a (получен из ВНИИСХМ, Пушкин, Россия), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Psp), штамм 1845 и *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus* (Cms), штамм 6889 из коллекции Центра коллективного пользования “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

Бактерии выращивали на твердых агаризованных средах, составленных по прописи из работы [41]. Суспензию с клетками (смыв с твердого субстрата) переносили в конические колбы с жидкой минимальной средой, приготовленной, как описано в работе [42], для 1-суточной адаптации, а также для использования в экспериментах по изучению влияния веществ на рост бактерий. При исследовании продуктов деструкции N-ФНА в клетках бактерий в среде для выращивания отсутствовали другие источники углерода. При сравнении скорости деструкции N-ФНА и преобразований дибутил- и диоктилфталатов бактериями для стимуляции увеличения биомассы бактерий в среду вносили 0.1% глюкозы.

Бактерии выращивали в колбах на роторной качалке без освещения при температуре 20–22°C. Титр бактерий в средах в начале экспериментов при исследованиях деградации N-ФНА составлял $1.5 \times 10^3$ кл./мл, а при изучении влияния на рост бактерий – $4.5 \times 10^3$ кл./мл. Титр определяли по оптической плотности среды с бактериями, измеренной на планшетном спектрофотометре “Immunochem-2100” при 675 нм (“High Technology Inc.”, США).

**Изучение роста бактерий.** Рост бактерий в присутствии 10 или 100 мкМ N-ФНА (коммерческий препарат, “Sigma”, США) контролировали по показателям КОЕ, измеряли титр по оптической плотности при 675 нм.

Для измерения количества КОЕ суспензию из колб высевали на твердые агаризованные среды. Твердые среды для ризобий и псевдомонад готовили, как описано в работе [41]. Среда для бактерий Cms готовилась на отваре из клубней карто-

феля с добавлением 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л глюкозы, 20 г/л агара (pH 7.0.).

Процент жизнеспособных клеток в составе аутоагрегатов бактерий, присутствовавших в культуральных средах, определяли по флуоресценции после обработки последовательно, 0.5%-ным пропидий йодидом (маркер для мертвых клеток), затем 50 мМ флуоресцеин диацетатом (маркер для живых клеток). Для просмотра бактерий-содержащих суспензий использовали инвертированный микроскоп "Axio Observer" ("Carl Zeiss Microscopy", Германия). Определяли процент живых клеток от общего количества клеток в составе плавающих в культуральной жидкости аутоагрегатов (скопление бактерий, погруженных в слизистую матрицу) на 10-ти случайно взятых полях.

**Получение экстрактов, содержащих ароматические продукты деструкции N-фенил-2-нафтиламина из культуральных сред и бактерий**. Выросшую культуру центрифугировали при 8000 g в течение 20 мин при 4°C. Из супернатанта ароматические соединения экстрагировали этилацетатом после подкисления 2 н HCl до pH 3.0–4.0. Осадок с клетками бактерий трехкратно промывали 20 мМ Трис-HCl-буфером, pH 8.0, содержащем 25 мкМ дитиотриетол и после каждой промывки клетки переосаждали (при 4°C). Клетки последовательно осаждали центрифугированием при 10000 g (20 мин.), при 16000 g (30 мин.) и при 20000 g (30 мин.), используя центрифуги моделей "Avanti J-26 XP JLA" 10.500 и "Allegra TM-64" ("Beckman Coulter", США). Осадок бактерий в небольшом объеме того же буфера помещали в холодильник на –70°C. Перед разрушением ультразвуком 0.2–0.5 г бактериальной массы отмывали от остатков буфера небольшим объемом бидистиллята. После центрифугирования при 5000 g 20 мин и 4°C осадок бактерий переносили в 5 мл свежего бидистиллята в стеклянные стаканчики для разрушения ультразвуком в ледяной бане. Полученный после обработки ультазвуком гомогенат переносили в конические колбы на 100 мл в 50 мл бидистиллята и после подкисления 2 н. HCl до pH 4.0 экстрагировали ароматические соединения этилацетатом.

Полученные экстракты упаривали досуха в вакууме в темноте, сухие остатки перерастворяли в небольших объемах этилацетата (для ГХ-МС-анализа) или метанола (для ВЭЖХ-анализа), и помещали в стеклянные бутылочки.

**Анализ состава ароматических соединений методом ГХ-МС.** Для изучения состава соединений методами ГХ-МС-анализа использовали экстракты культуральных сред и клеток бактерий. Анализ образцов проводили методом ГЖХ с масс-спектрометрическим детектором с использованием хромато-масс-спектрометра "7000QQQTripleQuad/7890A MSD/DS" ("Agilent Technology", США). Объем вводимой пробы 0.2 мкл, температура испарителя 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280°C. Диапазон сканирования 50–600 а. е. м. Капиллярная колонка HP-5MS (30 м × × 0.250 мм × 0.50 мкм), неподвижная фаза – 5%-ный фенилметилполисилоксан. Градиент температуры: от 100 до 280°C со скоростью 5°C/мин, 2 мин при 280°C, затем от 280 до 340°C со скоростью 5°C/мин. Подвижная фаза – гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Режим разделения потоков 5 : 1. Способ ионизации – электронный удар (ЭУ), энергия ионизации: 70 эВ. Анализ проводили в режиме регистрации полного ионного тока (SCAN). Для идентификации анализируемых соединений использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7, а также проводили сравнение с аутентичными образцами бис (2-этил-гексил) фталата (синоним – диоктилфталат), диэтилфталата ("Sigma–Aldrich", Германия) и дибутилфталата ("Реахим", Россия).

**Определение содержания N-ФНА методом ВЭЖХ**. Сравнение скорости деградации бактериями N-ФНА, внесенного в среды до концентрации 100 мкМ, проводили через 2 сут выращивания. Этилацетатные экстракты получали из культуральных жидкостей (**КЖ**), после отделения клеток бактерий центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин при 4 °C. Экстракты упаривали досуха, в остатке, растворенном небольшим объемом метанола, методом ВЭЖХ определяли количество N-ФНА. ВЭЖХ-анализ осуществляли на хроматографе "Shimadzu LC-10ATvp" с УФ-детектором ("Shimadzu", Япония,). Разделение содержавшихся в экстрактах фенольных компонентов проводили на колонке Perfect Bond, 250 × × 4.6 мм, 5 мкм в возрастающем градиенте A:B от 30 до 90% в течение 80 мин при скорости 0.5 мл/мин. A- ацетонитрил, B – 0.2 н. перхлорат Li в 0.1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты, pH 4.0. Объем пробы, вносимой на колонку – 5 мкл, детектирование при 280 нм. Количественные расчеты производили по адсорбционным профилям с использованием калибровочного графика, построенного для разных концентраций N-ФНА с величиной достоверности аппроксимации $R^2 = 0.96$. Показатели времени удерживания N-ФНА в адсорбционных профилях исследуемых экстрактов подтверждали УФ-спектрами, полученными в остановленном потоке элюента.

**Статистическая обработка данных.** Полученные результаты обрабатывали статистически, с вычислением средних значений и стандартных отклонений для них. Эксперименты проводили в трех биологических повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты исследования состава ароматических продуктов, образующихся при деградации 100 мкМ N-ФНА в КЖ и клетках бактерий, методом ГХ-МС. По значениям

**Таблица 1.** Состав продуктов деструкции 100 мкМ N-ФНА в этилацетатных экстрактах из КЖ и клеток бактерий после 2 сут культивирования

| Соединение | Место обнаружения | $t_{уд.}$, мин | Ver., % | *S*, % | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Rhiz | Psp | Cms |
| 1.2.3.4-тетрагидро-нафталин | Клетки | 5.121 | 21.1 | 0.23 | 0.03 | 0 |
| 2-метил-1,2,3,4,-тетрагидро-нафталин | Клетки | 6.024 | 20.1 | 0.13 | 0.02 | 0 |
| 6-метил-1,2,3,4,-тетрагидро-нафталин | Клетки | 6.945 | 40.9 | 0.24 | 0.03 | <0.01 |
| 1,7-диметил-нафталин | Клетки | 10.159 | 17.7 | 0.28 | 0.04 | 0 |
| Бутил-надецилфталат | Клетки | 19.677 | 13.3 | 0 | 0.01 | 0 |
| Диэтилфталат | Среда | 14.338 | 71.0 | 1.32 | 1.55 | 0.9 |
| Дибутилфталат | Клетки | 21.651 | 43.6 | 0.43 | 0.39 | 0.09 |
| | Среда | | | 4.28 | 2.82 | 3.96 |
| Диоктилфталат | Клетки | 31.586 | 60.1 | 0.28 | 0.27 | 0.21 |
| | Среда | | | 0.62 | 0.6 | 0.68 |

Примечание: $t_{уд.}$ – время удерживания, Ver, % – вероятность, *S*, % – относительная площадь пика. (*S*, % для N-ФНА в каждом из экстрактов принята за 100). Приведены средние показатели для *S*, % (стандартные отклонения для них не превышали 10% от средних значений) из трех экспериментов. Rhiz–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; Psp – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*; Cms – *Clavibacter michiganensis* sps. *Sepedonicus.*

относительных показателей площадей пиков соединений (*S*, %, табл. 1) среди продуктов деструкции N-ФНА преобладали фталаты. При этом содержание фталатов (сумма *S*, %) в экстрактах из КЖ, превосходило содержание их в экстрактах из клеток бактерий, что свидетельствовало о секреции этих соединений во внешнюю среду (КЖ) клетками бактерий. Среди фталатов, идентифицированных в экстрактах из КЖ, самый больший процент приходился на дибутилфталат (табл. 1). В меньшем количестве бактерии секретировали в среду диоктил- и диэтилфталаты.

Все перечисленные выше виды фталатов идентифицированы по степени вероятной сходимости с данными для этих соединений из библиотеки NIST08 (см. табл. 1, 2) и при сравнении ионных спектров исследуемых соединения и их аутентичных образцов (рис. 1). Диэтилфталат обнаружен только в КЖ, что может указывать на более активную, по сравнению с другими видами фталатов, секрецию его из клеток бактерий во внешнюю среду. Необходимо отметить, что данный вид фталата не выявлялся в КЖ среди продуктов деструкции 10 мкМ N-ФНА [23]. Появление диэтилфталата среди продуктов деградации N-ФНА может указывать на изменения в катаболической цепи превращений данного субстрата при его высокой концентрации

Только в экстрактах из клеток найдены соединения нафталиновой структуры (табл. 1): четыре у *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rhiz) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Psp) и одно – у *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus* (**Cms**). В клетках всех видов бактерий, выросших на N-ФНА и без него, обнаружен небольшой процент азотсодержащего одноядерного ароматического соединения – дифениламина, синтез которого в клетках бактерий, очевидно, не связан с деградацией N-ФНА.

В работе [39] приведены примеры преобразования бактериями одних видов фталатов в другие путем изменения размеров алкильных цепочек, связанных эфирной связью с *о*-фталевой кислотой. Данные ГХ-МС-анализа в табл. 2 для экстрактов КЖ, полученных через 1 сут культивирования бактерий *Rhizobium* и *Pseudomonas* с 10 мкМ дибутилфталата, позволили обнаружить у этих бактерий способность к преобразованию дибутилфталата по появлению в среде других видов фталатов. Соотношение площадей пиков для дибутилфталата и фталатов, образовавшихся из дибутилфталата (см. табл. 2), позволяет сравнить активность процесса преобразования фталатов у ризобий и псевдомонад. Степень изменения этого соотношения в сторону вновь появившихся фталатов свидетельствует о более высокой активности преобразования дибутилфталата в другие видов фталатов у ризобий. Более активными, по сравнению с псевдомонадами, оказались ризобии и при трансформации диоктилфталата (данные не представлены). Оба вида бактерий обнаруживали значительно меньшую активность в преобразовании данного субстрата, по сравнению с дибутилфталатом. Оказалось, что даже после 2-суточного выращивангия с 10 мкМ диоктилфталата в экстрактах КЖ обоих видов бактерий суммы площадей пиков для образовавшихся из него дибутил-, бутил-тетрадецил- и диметилфталатов относительно диоктилфталата составляли у ризобий 4.4%, у псевдомонад – менее 2.0%.

При оценке значения N-ФНА и фталатов при негативной регуляции формирования растительно-микробных взаимодействий важны показатели их влияния на рост бактерий и агрегацию бактерий в биопленки. Известно, что интеграция в биопленки позволяет бактериям быть защищенными от внешних воздействий и, возможно, способствовать поверхностной колонизации корней.

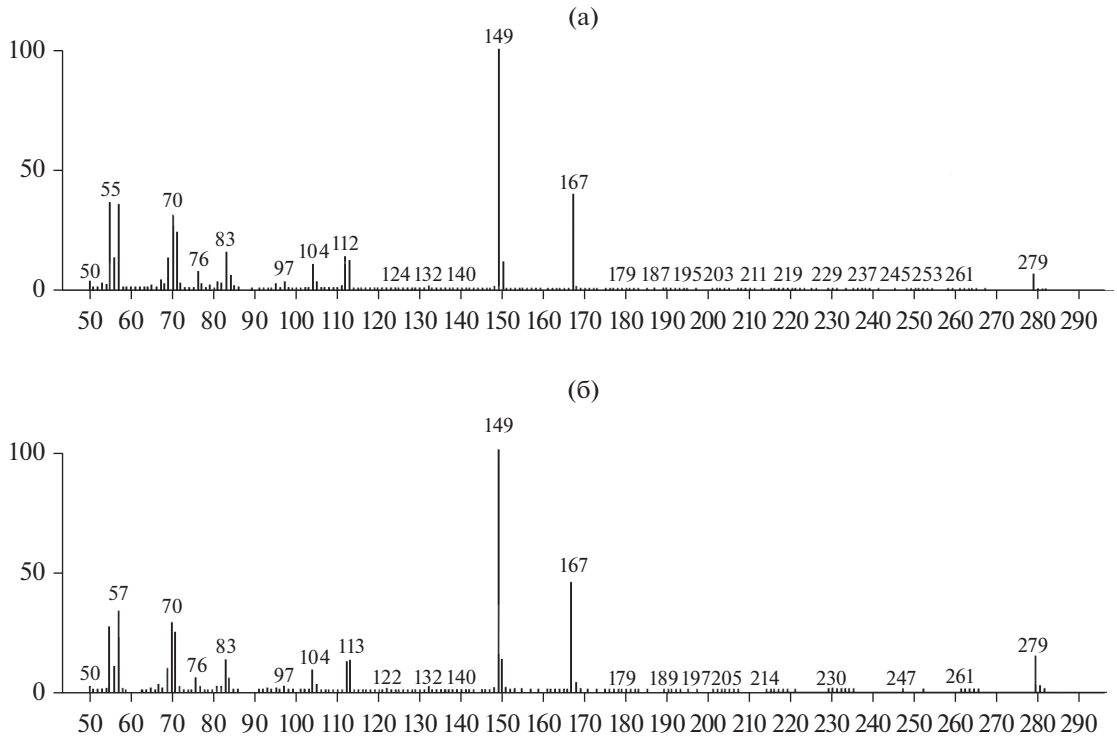


**Рис. 1.** Масс-спектры образца бис(2-этилгексил)фталата (диоктилфталат) (а) и экстракта из КЖ и клеток бактерий (б), выращенных в присутствии N-ФНА.

Из результатов работ [18–20] следует, что для заметного подавления роста бактерий Cms необходима в 5 раз более высокая концентрация N-ФНА, чем для микросимбионтов гороха *Rhizobium* и *Pseudomonas*. В табл. 3 и на рис. 2 приведены данные по влиянию N-ФНА на те же виды бактерий, рост которых в планктонной культуре осуществлялся в условиях олиготрофного питания в минимальной жидкой среде с 0.1% углеводов или без них (при изучении состава продуктов в клетках бактерий). Отсутствие дополнительных углеводов в среде требовалось для более корректной оценки катаболизма бактериями изучаемого ароматического соединения, а фенольные соединения, образующиеся в клетках из углеводов, могли изменить показатели [33]. Условия олиготрофного питания обеспечивали рост бактерий, но по сравнению с условиями роста в богатой органическими соединениями среде приводили к уменьшению длительности стационарной фазы роста и к гибели большой части клеток [19, 20]. Об этом свидетельствовали результаты определения процента жизнеспособных клеток в среде (табл. 3), которые снижались на 2 сут культивирования по мере расходования углеводородных источников питания, и показателей КОЕ. Рассчитанные по показателям КОЕ относительные показатели роста бактерий (рис. 2), свидетельствовали о различной степени негативного действия N-ФНА на рост исследуемых видов бактерий в 1 и 2 сут

**Таблица 2.** Состав ароматических соединений, идентифицированных методами ГХ-МС-анализа в этилацетатных экстрактах из культуральной среды бактерий, выращенных 1 сут в присутствии 10 мкМ дибутилфталата*

| Соединение | $t_{уд.}$, мин | Ver, % | *S*, % | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Rhiz | Psp |
| Диизононилфталат | 35.303 | 69.3 | 0 | 1.37 ± 0.17 |
| Бутил-8-метилнонил фталат | 26.999 | 12.4 | 6.09 | 0 |
| Бутил-надецил фталат | 27.008 | 17.6 | 0 | 4.21 ± 0.06 |
| Бутил-тетрадецил фталат | 19.792 | 21.2 | 0.50 ± 0.06 | 0 |
| Дибутилфталат | 21.731 | 34.8 | 95.78 ± 2.6 | 100 ± 0.00 |
| Диоктилфталат | 31.639 | 45 | 100 ± 0.00 | 4.05 ± 0.03 |
| Фталевый ангидрид | 8.007 | 74.3 | 0.37 ± 0.05 | 0.05 ± 0.01 |

* Обозначения как в табл. 1.

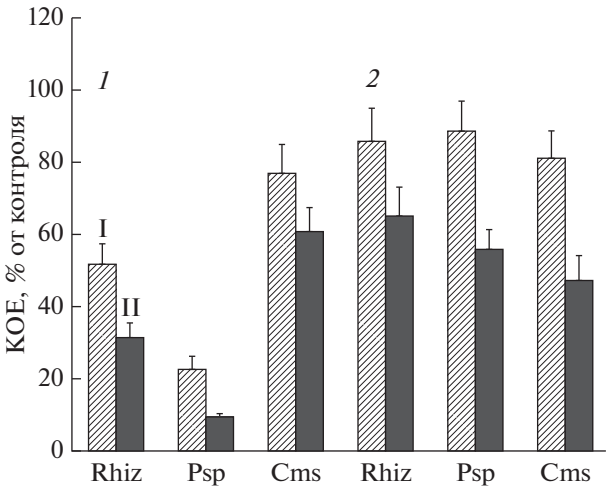


**Рис. 2.** Влияние N-ФНА в концентрации 10 (I) и 100 (II) мкМ на рост бактерий на 1 (*1*) и 2 (*2*) сут роста бактерий на среде с N-ФНА. Rhiz–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; Psp – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*; Cms – *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*.

культивирования, и об усилении ингибирования их роста при концентрации 100 мкМ. Ингибирование ростовых процессов у симбионтов гороха (ризобии и псевдомонады) в 1 сут более выражено по сравнению с Cms. На 2 сут заметна разница между исследуемыми видами бактерий по степени ингибирования их размножения только при концентрации N-ФНА 100 мкМ, при этом в наибольшей мере подавлялся рост бактерий Cms.

Повышение относительных показателей роста бактерий на вторые сутки экспозиции (рис. 2) могут указывать на появление среди продуктов распада N-ФНА соединений, которые могут быть для клеток и источником углерода, и стимулировать рост. Такое заключение можно было сделать при наблюдении за накоплением биомассы бактерий, хотя и очень слабым, когда в среды не вносили углеводный источник питания, а N-ФНА был единственным источником углеводорода. Возможно, что в данном случае у бактерий для образования необходимых для их роста метаболитов происходила индукция ферментов деградации бензольного фрагмента, отщепленного от молекулы N-ФНА. Предполагаемый процесс расщепления бензольного кольца, вероятно, осуществляется по пути альтернативному фталатному, поскольку подтверждений полного распада фталатов в КЖ и в клетках исследуемых видов бактерий не было получено. Одним из подтверждений может быть присутствие в изучаемых экстрактах конечного ароматического продукта распада фталатов по β-кетоадипатному пути – протокатеховой кислоты [26]. Однако данное вещество не было найдено ни в одной из исследуемых нами КЖ, куда вместе с бактериями вносили N-ФНА.

В обсуждаемых экспериментах рост исследуемых видов бактерий, по-видимому, зависел от особенностей катаболизма N-ФНА в их клетках, скорости деградации данного субстрата до образования фталатов. Как следует из рис. 3, скорость деградации N-ФНА при его концентрации в среде 100 мкМ наиболее высокая у ризобий, немного ниже она у псевдомонад и самая низкая у бактерий Cms. Следует отметить, что за 2-суточный период наблюдений при указанной концентрации N-ФНА суммарное содержание фталатов в клетках и КЖ, определенное по относительным показателям площадей пиков (*S*, %), у исследуемых бактерий составляла 5.6–7.0% (от площади пика для N-ФНА). Различия в скорости деструкции N-ФНА у исследуемых видов бактерий не приводили к заметной разнице в содержании фталатов, хотя их количество в среде как и скорость деструкции N-ФНА были наибольшими у ризобий (табл. 1).

Сопоставление относительных показателей площадей пиков для фталатов в КЖ бактерий из табл. 1 с данными табл. 4 позволяет увидеть разницу в скорости деградации N-ФНА при концентрациях вещества в средах 10 и 100 мкМ. Сотношение суммарного содержания фталатов к N-ФНА показывает, что оно более высокое при концентрации субстрата 10 мкМ. При этой концентрации N-ФНА в КЖ с ризобиями содержание фталатов превышало содержание деградируемого субстрата в 3.5 раза, в среде с псевдомонадами – в 1.3 раза, а в КЖ с Cms фталаты составляли только 22% от количе-

**Таблица 3.** Процент жизнеспособных клеток в составе аутоагрегатов бактерий в планктонных культурах без внесения (контроль) и с внесением в среду 10 и 100 мкМ N-ФНА

| Вариант | Период экспозиции, сут | Вид бактерий* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Rhiz | Psp | Cms |
| Контроль | 1 | 8.2 ± 1.7 | 15.0 ± 4.7 | 17.5 ± 3.5 |
| | 2 | 4.0 ± 1.6 | 8.0 ± 1.6 | 10.0 ± 2.6 |
| 10 мкМ | 1 | 3.2 ± 1.2 | 4.8 ± 2.2 | 11.0 ± 3.2 |
| N-ФНА | 2 | 1.0 ± 0.0 | 5.5 ± 2.6 | 1.8 ± 0.9 |
| 100 мкМ | 1 | 3.0 ± 0.7 | 3.5 ± 1.2 | 4.0 ± 1.6 |
| N-ФНА | 2 | 0.5 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | 0.8 ± 0.3 |

* Rhiz–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; Psp – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*; Cms – *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*.

ства N-ФНА (табл. 4). По-видимому, при 10 мкМ в большей степени, чем при 100 мкМ N-ФНА активизированы процессы деструкции с образованием фталатов и выведение их из клеток во внешнюю среду. Полученные результаты позволяют заключить, что при концентрации 100 мкМ одновременно с усилением ингибированием роста бактерий (рис. 2), ингибируется и процесс катаболизма N-ФНА в бактериальных клетках. Показатели соотношения площадей пиков, указывающие на активность катаболизма N-ФНА у исследуемых видов бактерий, позволяют предположить различные механизмы действия N-ФНА на метаболические процессы бактерий при его различных концентрациях. Вероятно, при повышенной аккумуляции N-ФНА в бактериальных клетках идет торможение метаболических процессов, чему могут способствовать высокая липофильность и высокая антиоксидантная активность этого соединения [8, 22]. Предполагают также, что в результате свободного прохождения N-ФНА через мембраны и значительного накопления его в клетках, а также высокой активности соединения может происходить нарушение структуры мембран [8].

Сведения для фталатов, характеризующие механизмы их действия на метаболические процессы живых клеток, в настоящее время в литературе отсутствуют. Тем не менее, для дибутил-, диоктил- и диэтилфталатов, образующихся из N-ФНА в клетках исследуемых нами видов бактерий (табл. 1), результаты работ [30, 31, 37, 43, 44] позволяют оценить их влияние на ростовые процессы разных видов бактерий. Дибутилфталат для многих видов бактерий может быть стимулятором размножения, а возможность его полной деградации этими бактерий [30], позволяет использовать его в качестве источника углерода для них.

В работе [37] показано, что эффект фталатов на бактерии может зависеть от их химической структуры, от состояния бактерий (находятся они в планктонной культуре или в виде биопленок), а также от их видовой принадлежности. Одни и те же концентрации дибутилфталата (10, 20, 30 мкМ) в разной степени стимулировали рост патогенных бактерий Cms и *Pectobacterium carotovorum* ssp.*carotovorum* при

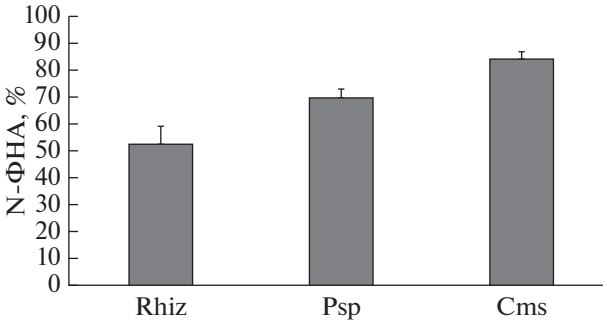


**Рис. 3.** Содержание N-ФНА (% в среде относительно содержания в КЖ без бактерий) в КЖ через 2 сут выращивания. Rhiz–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; Psp – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*; Cms – *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*.

глубинном выращивании, но подавлял образование биопленок. При глубинном выращивании в присутствии диоктилфталата наблюдали зависимое от концентрации подавление роста бактерий Cms и стимуляцию некротрофных бактерий *P. carotovorum*. У обоих видов бактерий процесс формирования биопленок ингибировался, но при этом у Cms – начиная с концентрации 10 мкМ, а у *P. carotovorum* – только при концентрациях 20 и 30 мкМ.

Антибиотические свойства диоктилфталата и диизононилфтатата по отношению к достаточно широкому ряду бактерий были показаны в работах [31, 43]. Появление диизононилфталата в ризосфере растений гороха вероятно при преобразовании дибутилфталата бактериями *Pseudomonas*, а также в результате его секреции корневыми клетками растения при неблагоприятных условиях среды [40].

Роль высокотоксичного диэтилфталата в негативной регуляции растительно-микробных взаимодействий может определяться его участием в деструкции липопротеиновых комплексов живых клеток [44].

В приведенной выше работе [37] показаны стимуляция роста бактерий в планктонной культуре при действии дибутилфталата и ингибирование его при действии диоктилфталата. В на-

**Таблица 4.** Состав продуктов деструкции 10 мкМ N-ФНА в этилацетатных экстрактах из ростовой среды бактерий после 1 сут экспозиции

| Соединение | $t_{уд.}$, мин | Ver., % | *S*, % | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Rhiz | Psp | Cms |
| Фталевый ангидрид | 10.159 | 42.4 | 0.32 | 0.19 | 0.65 |
| Бутил-тетрадецил фталат | 19.677 | 21.2 | – | – | 2.28 |
| Дибутилфталат | 21.651 | 43.6 | 3.21 | 74.04 | 19.33 |
| N-фенил-2-нафтиламин | 26.743 | 68.8 | 30.23 | 100 | 100 |
| Диоктилфталат | 31.586 | 60.1 | 100 | 60.13 | – |
| Диизононилфталат | 32.499 | 56.7 | 1.16 | – | – |

Примечание. $t_{уд.}$, Ver, %, *S*, % как в табл. 1. Приведены средние показатели для *S* (%), стандартные отклонения для них не превышали 10% от средних значений.

стоящей работе было установлено различное действие внесенного в ростовую среду дибутилфталата (10 мкМ) на рост в ризобий и псевдомонад в 1 и 2 сут культивирования. Оказалось, что титр клеток относительно контроля возрастал в 1 сут выращивания у ризобий в 1.5 раза, у псевдомонад – в 1.3 раза. На 2 сут, возможно в результате выхода в среду к концу 1 сут диоктилфталата при выращивании ризобий, а в среде с псевдомонадами диоктил- и диизононилфталатов (табл. 2), происходило ингибирование роста этих бактерий в 1.7 и 1.3 раза соответственно. Можно утверждать, что для трех изучаемых нами видов бактерий диоктилфталат являлся ингибитором роста. Вместе с данным соединением в подавлении роста псевдомонад вероятно участвовал и диизононилфталат, негативное действие которого на бактерии были отмечены в работе [43].

Полученные нами результаты показывают, что исследуемые виды бактерий способны деградировать N-ФНА с разной скоростью, в то же время данное соединение в различной степени ингибировало рост бактерий.

Результаты исследования высоких концентраций ризобий на ростовые процессы проростков гороха [45] указывают на важность регуляции со стороны растения концентрации этих бактерий в его ризосфере для устранения излишней инфекционной нагрузки с помощью различных соединений. Участие N-ФНА и фталатов возможно при регуляции концентрации клеток в ризосфере гороха не только при инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, проникающих в корни бобового растения, но и при инокуляции *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, не инфицирующих корни гороха, но поражающих его надземные органы.

Чувствительным к действию тех же соединений оказался процесс формирования биопленок у трех исследуемых видов бактерий [19, 20, 37], их колонизирующая активность (формирования биопленок на поверхности корней) регулируется с участием N-ФНА и фталатов.

Наиболее активными по скорости деградации N-ФНА и образования фталатов из исследованных видов бактерий оказались *R. leguminosarum*. Можно предположить, что этот микросимбионт растений гороха играет большую роль в контролировании видового состава ризосферной микробиоты. Этот контроль может осуществляться с помощью секретируемых производных фталатов, образовавшихся из N-ФНА и появившихся при преобразовании фталатов, присутствующих в корневых экссудатах корневых клеток растения [18, 40].

Таким образом, приведенные выше результаты позволяют предположить, что N-ФНА и фталаты, образующиеся из N-ФНА при участии ризосферных бактерий и присутствующие в составе корневых экссудатов растения, вероятно, могут участвовать в регуляции взаимоотношений между растением и бактериями. Неоднозначное действие N-ФНА и фталатов на различные виды бактерий может быть определяющим для селекции видов в составе микробиоты в ризосфере растительных культур, синтезирующих эти соединения.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *D’Arcy–Lameta A.* // Plant and Soil. 1986. V. 92. № 1. P. 113–123
2. *Shaw L.J., Morris P., Hooker J.E.* // Environmental Microbiology. 2006. V. 8. № 11. P. 1867–1880.
3. *Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A.* // African J. Biotechnol. 2007. V. 6. № 12. P. 1358–1368.
4. *Кузмичева Ю.В., Шапошников А.И., Азарова Т.С., Петрова С.Н., Наумкина Т.С., Борисов А.Ю., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Парахин Н.В., Тихонович И.А.* // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 1. С. 121–128.
5. *Hassan S., Mathesius U.* // J. Exp. Botany. 2012. V. 63. № 9. P. 3429–3444.
6. *Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Möder M., Segner H., Schüürmann G.* // Archives of Invironmental Contamination and Toxicology. 1999. V. 37. № 2. P. 164–174.
7. *Hauser R., Calafat A.M.* // Occup Environ Med. 2005. V. 62. № 11. P. 806–818.
8. *Altenburger R., Brak W., Greco W.R., Groot M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Küster E.* // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. №. 19. P. 6163–6169.
9. *Mankidy R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P.* // Toxicol. Letters. 2013. V. 217. P. 50–58.
10. *Ma T., Teng Y., Christie P., Luo Y.* // Front. Environ. Sci. Eng. 2015. V. 9. № 2. P. 259–268.
11. *Paul L. Schiff Jr.* Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. V. 11. N.Y.: Pergamon Press, 1996. P. 1–236.
12. *Yu R., Li B.-G., Ye Q., Zhang G.-l.* // Natural Product Research. 2005. V. 19. № 4. P. 359–362.
13. *Султанходжаев М.Н., Таджибаев М.М.* // Химия природных соединений. 1976. Т. 12. № 3. С. 406.
14. *Евстратова Р.И., Запесочная Г.Г.* // Химия природных соединений. 1977. № 4. С. 582.
15. *Жанаева Т.А., Кривощекова О.Е., Семенов А.А., Минаева В.Г.* // Химия природных соединений. 1989. Т. 25. № 3. С. 377.
16. *Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., Fan X.* // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi., 2005. V. 30. № 5. P. 347–350.
17. *Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F.* // Allelopathy J. 2007. V. 20. № 2. P. 327–338.
18. *Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 394–403.
19. *Ломоватская Л.А. Макарова Л.Е., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М.* // Прикл. биохимии микробиология, 2016. Т. 52. № 3. С. 306–311.
20. *Ломоватская Л.А., Гончарова А.М., Макарова Л.Е., Филинова Н.В., Романенко А.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 313–319.

21. *Weiss T., Bolt H.M., Schlüter G., Koslitz S., Taeger D., Welge P., Brüning T.* // Arch. Toxicol. 2013. V. 87. № 7. P. 1265–1272.
22. *Marek E.V., Koslitz S., Weiss T., Fartasch M., Schlüter G., Käfferlein H.U. Brüning T.* // Arch Toxicol. 2017. V. 91. № 11. P. 3587–3596.
23. *Макарова Л.Е., Мориц А.С.* Фенольные соединения: функциональная роль в растениях // Сб. научн. статей по материалам X межд. симпозиума "Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты". М.: PRESS-BOOK.RU, 2018. С. 258–262.
24. *Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W.* // Environmental Health Perspectives. 1976. V. 18. P. 159–166.
25. *Kiyohara H., Nagao K.* // J. Gen. Microbiol. 1978. V. 105. № 1. P. 69–75.
26. *Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Карпов А.В., Боронин А.М.* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 1. С. 11–20.
27. *Seo J.S., Keum Y.-S., Li Q.X.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2009. V. 6. P. 279–309.
28. *Eaton R.W., Ribbons D.W.* // J. Bacteriol. 1982. V. 151. № 1. P. 48-57.
29. *Chang H.K., Zylstra G.J.* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 24. P. 6529-6537.
30. *Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. № 2. P. 183–198.
31. *Alim Al-Bari M.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A.* // Research J. Medical Sciences. 2006. V. 1. № 2. P. 77–81.
32. *Babu B., Wu J.-T.* // Science of the Total Environment. 2010. V. 408. № 21. P. 4969–4975.
33. *Parke D., Ornston L.N.* // J. Bacteriol. 1986. V. 165. № 1. P. 288–292.
34. *Husein A.I., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Jondi W.J., Zatar N.A-A.* // Int. J. Curr. Res. Aca. Rev. 2014. V. 2. № 9. P. 195–203.
35. *Семенов А.А., Еникеев А.Г., Снеткова Л.В., Пермяков А.В., Соколова Н.А., Дударева Л.В.* // Докл. Академии наук. 2016. Т. 471. № 3. С. 366–367.
36. *Kim S.-J., Kim S.-I., Han Y.-S.* // Corean J. Gerontology. 1997. V. 7. № 3. P. 70–76.
37. *Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Еникеев А.Г., Бояркина С.В., Гвильдис Д.Э., Семенов А.А.* // Докл. Академии наук. 2018. Т. 480. № 3. С. 381–383.
38. *Krishnan S., Prabhu Y., Phale P.S.* // Indian J. Biochem. & Biophysics. 2004. V. 41. № 5. P. 227–232.
39. *Пастухова Е.С., Егорова Д.О., Ястребова О.В., Плотникова Е.Г.* // Вестник Пермского ун-та. Биология. 2010. № 3. С. 24–28.
40. *Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А., Нестеркина И.С.* Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. Сборник материалов Годичного собрания ОФР, Всеросс. научн. конф. Иркутск: Изд-во Ин-та географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018. С. 488–492. https://doi.org/10.31255/978-5-94797-319-8-488-491
41. *Берестецкий В.А.* Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л.: ВНИИСХМ, 1976. 31 с.
42. *Hartwig U.A., Josef C.M., Phillips D.A.* // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 3. P. 797–803.
43. *Santi V., Kannagi A.* // J. Chem. Pharm. Res. 2016. V. 8. № 3. P. 700–707.
44. *Kim S.M., Yoo J.A., Baek J.M., Cho K.H.* // Toxicology in Vitro. 2015. V. 30. № 1. Part B. P. 383–393.
45. *Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В.* // Физиол. растений. 1999. Т. 46. № 5. С. 806–810.

# Studying N-phenyl-2-naphthylamine Degradation by Bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*

**L. E. Makarova[a, *], A. S. Morits[a], N. A. Sokolova[a], I. G. Petrova[a], A. A. Semenov[a], L. V. Dudareva[a], M. S. Tretyakova[a], and A. V. Sidorov[a, b]**

[a] *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

[b] *Irkutsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Irkutsk, 664033 Russia*

**e-mail: makarova@sifibr.irk.ru*

Received March 28, 2019; revised August 27, 2019; accepted August 30, 2019

Study of the composition of aromatic compounds in a liquid culture medium and in bacterial cells of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus* grown in the presence of the negative allelopathic compound N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA), found in the root exudates of legumes, showed that the main products of its degradation are phthalates. Bacteria can actively secrete them into the environment and convert some types of phthalates to others by changing the alkyl groups in their molecules linked by an ether bond with o-phthalic acid. The differences of the studied bacteria by the rate of N-PNA degradation (10 and 100 μM), its effect on viability and growth are shown. Assumptions were made about the possible mechanisms for regulating the composition of bacteria and their abundance in the rhizosphere of leguminous plants with N-PNA and phthalates secreted by roots in exudates, as well as phthalates formed during the degradation of N-PNA in bacterial cells.

*Keywords: Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus*, N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates, degradation

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 174–181

УДК 579.22

# ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ НА АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ

**© 2020 г. С. А. Аленькина[1], *, В. Е. Никитина[1]**

[1]*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049 Россия*

**e-mail: alenkina_s@ibppm.ru*

Поступила в редакцию 30.07.2019 г.
После доработки 10.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Изучали влияние лектинов двух штаммов азоспирилл, *Azospirillum brasilense* Sp7 (эпифит) и *Azospirillum brasilense* Sp245 (эндофит), на активность аскорбатпероксидазы и содержание аскорбиновой кислоты в корнях этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при смоделированных абиотических стрессах, включающих действие гипо-(+5°C), гипертермии (+42°C), засоления (1%-ным NaCl), засухи (5%-ной сахарозой) и тяжелых металлов ($CoSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(CH_3COO)_2$ и $CuSO_4$). Показано, что оба лектина вызывали увеличение активности аскорбатпероксидазы и содержания аскорбата в корнях проростков при действии стрессовых факторов. На основании полученных данных высказано предположение, что антиоксидантное действие лектинов азоспирилл при абиотических стрессах вызывало защитный эффект этих белков по отношению к корням проростков пшеницы.

*Ключевые слова:* ассоциативная азотфиксация, азоспириллы, лектины, корни проростков пшеницы, антиоксидантная система, аскорбатпероксидаза, аскорбиновая кислота, абиотические стрессы

**DOI:** 10.31857/S0555109920020026

Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур, эффективное и ограниченное использование удобрений и средств защиты растений, а также повышение их устойчивости и адаптации к неблагоприятным агроклиматическим условиям и антропогенным воздействиям являются актуальными вопросами современного сельского хозяйства. Решение этих задач привлекает внимание многих ученых, работающих в различных областях науки: растениеводстве, почвоведении, агрономии, агрохимии, экологии, микробиологии и других. Особенно важными и перспективными являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов, а также биологических механизмов взаимодействия компонентов растительно-микробных систем.

Неблагоприятные климатические условия, создающие абиотические стрессы, относятся к основным ограничивающими факторами снижения продуктивности сельскохозяйственных культур, среди которых доминируют такие абиотические стрессы как засуха, низкая/высокая температура, засоление и воздействие тяжелых металлов. В последние несколько десятилетий большое внимание уделяется изучению роли микроорганизмов в их облегчении для растений. Микробы с их потенциальными внутренними метаболическими и генетическими способностями уменьшают действие абиотических стрессов на растения [1, 2].

Так, показано, что ризобактерии, обладающие потенциалом стимулировать рост и развитие растений, так называемые PGPR, могут также нивелировать неблагоприятные эффекты абиотических стрессов на их рост [3, 4]. Была продемонстрирована роль нескольких обитателей ризосферы, принадлежащих к родам *Pseudomonas* [1], *Azotobacter* [2], *Azospirillum* [5], *Rhizobium* [1], *Bacillus* и *Enterobacter* [1], в стимуляции роста растений и смягчения множественных видов абиотических стрессов.

Ассоциативные бактерии рода *Azospirillum* занимают важное место среди микроорганизмов, обладающих потенциалом стимулировать рост и развитие растений. Растения получают непосредственную выгоду от способности микроорганизмов к азотфиксации, продукции фитогормонов, солюбилизации фосфатов, улучшению водного и минерального статуса, продукции ряда соединений, увеличивающих мембранную активность, пролиферацию тканей корневой системы, а также осуществляют контроль многочисленных фитопатогенов [6–8].

Азоспириллы колонизируют как поверхность корня, так и внутренние ткани. Штамм *A. brasilense* Sp245 был найден в ксилеме корня, а штамм *A. brasilense* Sp7 был обнаружен на его поверхности [9]. Эндофитные бактерии представляют особый интерес, поскольку они способны мутуалистически жить внутри растительных тканей, что позволяет им в меньшей степени по сравнению с другими микроорганизмами зависеть от внешних факторов среды и одновременно проявлять комплекс хозяйственно полезных свойств. При этом однажды внедрившись в ткани растения, эндофиты могут способствовать формированию длительной защиты макроорганизма от стрессовых факторов окружающей среды [10].

Среди высокомолекулярных и специфичных веществ, участвующих в межорганизменной коммуникации, важная роль принадлежит лектинам – (глико)протеинам, связывающим строго определенные углеводные группы на поверхности клетки-мишени. Роль растительных лектинов в колонизации бактериями растения-хозяина и перестройке метаболизма бактерии-симбионта характеризуется уже довольно большой доказательной базой [11]. Также показана адаптогенная активность растительных лектинов по отношению к растениям [12]. Бактериальные лектины являются участниками "молекулярного диалога", важного для формирования симбиоза, хотя данных об их роли намного меньше [13, 14].

Ранее было показано присутствие на поверхности клеток азоспирилл лектинов, вовлеченных в бактериальную адгезию к корням. С поверхности двух штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245, отличающихся по способу колонизации растений, были изолированы лектины, представляющие собой гликопротеины с различными молекулярными массами и углеводной специфичностью. Лектин *A. brasilense* Sp7 имел молекулярную массу 36 кДа и проявлял специфичность к L-фукозе (1.87 мМ) и D-галактозе (20 мМ). Лектин *A. brasilense* Sp245 проявлял сродство к собственному полисахариду – кислому D-рамнану и имел молекулярную массу 67 кДа [15, 16].

Накопившиеся обширные экспериментальные данные о лектинах азоспирилл свидетельствют об их полифункциональности. Так, лектины способны не только обратимо и специфически связываться с клетками-мишенями, но и быть биологически активными веществами, способными в низких концентрациях вызывать клеточные ответы. Этот факт нашел подтверждение в предыдущих исследованиях по изучению влияния лектинов азоспирилл на прорастание семян [17], митогенную и ферментмодифицирующую активности и изменение содержания стрессовых метаболитов в растительной клетке [8, 18–20]. Последнее свидетельствует о способности лектинов выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы [15].

В растении под действием одного или нескольких стресс-факторов, происходит индукция защитного ответа, который позволяет ему выживать и адаптироваться к изменившимся внешним условиям.

Аскорбиновая кислота (аскорбат) является одним из наиболее стабильных низкомолекулярных антиоксидантов растительных клеток [21]. Аскорбат задействован в функционировании не только неферментативной и ферментативной составляющих антиоксидантной системы, но и в клеточной сигнализации [22]. В то же время связь между содержанием аскорбата и устойчивостью растений к стрессорам далеко неоднозначна. Так, показано, что растения, сверхэкспрессирующие дегидроаскорбатредуктазу, были более устойчивы к озону, хлориду натрия и ПЭГ [21, 23]. В то же время растения с повышенным редокс-статусом аскорбата в замыкающих клетках отличались большей устьичной проводимостью и меньшей засухоустойчивостью [21].

Аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.11) является важным компонентом ферментативной антиоксидантной системы растений. Функция этого фермента заключается в обезвреживании пероксида водорода. Аскорбатпероксидаза высокоаффинна к аскорбату и локализована как в хлоропластах, так и в цитоплазме, митохондриях, пероксисомах и апопласте [24]. Имеются сведения об участии этого фермента в адаптивных реакциях растений на абиотические стрессоры [23].

Цель работы – сравнительное изучение роли лектинов *A. brasilense* эпифитного Sp7 и эндофитного штаммов Sp245 в изменении активности аскорбатпероксидазы и содержания аскорбата в корнях проростков пшеницы при смоделированных абиотических стрессах.

## МЕТОДИКА

**Микроорганизмы и условия культивирования.** Объектом исследования служили два штамма азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum, A. brasilense* Sp7, полученного из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (Россия) и *A. brasilense* Sp245 из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия, http://collection.ibppm.ru).

**Получение препаратов лектинов**. Выделение лектинов с поверхности клеток бактерий осуществляли по методу [25]. Очистку белков проводили гель-фильтрацией на колонке (30 × 2.2 см) с сефадексом G-75 (диаметр частиц 40–120 мкм). Выход белковых фракций фиксировали на приборе Uvicord S11 ("LKB", Швеция) при $\lambda$ = 278 нм. В качестве элюентов использовали 0.1 М $CH_3COOH$ (pH 4.8), а также 0.05 М фосфатный буфер (pH 7.0),

содержавший 0.15 М NaCl. Скорость потока – 1.5 мл/мин. Лектиновую активность определяли реакцией агглютинации, используя 2%-ную суспензию трипсинизированных кроличьих эритроцитов.

**Определение концентрации белка.** Количество белка определяли по методу Бредфорд [26].

**Стерилизация семян, получение корней проростков и предобработка корней препаратами лектинов при воздействии стрессовых факторов.** Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта "Саратовская 29" (ГНУ НИИ Сельского хозяйства Юго-Востока РСХА, Россия) были поверхностно стерилизованы в 70%-ном (v/v) этаноле в течение 1 мин и отмыты стерильной водой. Для получения корней проростков семена выращивали в асептических условиях в чашках Петри на стерильной дистиллированной воде и инкубировали в темноте при 25°С. Для экспериментов были использованы четырехдневные проростки.

Для изучения влияния стресса на изучаемые параметры корни в течение 2 ч подвергали совместному воздействию 1%-ной NaCl и 5%-ной сахарозе при 5 и 42°С (5–40 мкг/мл) лектинов и (1 мМ) тяжелых металлов ($CoSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(CH_3COO)_2$ и $CuSO_4$) [27]. В качестве контроля использовали корни проростков, выращенные при 25°С. Затем корни гомогенизировали в 0.15 М фосфатном буфере, pH 7.8. Гомогенат центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость использовали для определения активности аскорбатпероксидазы и аскорбиновой кислоты.

**Определение активности аскорбатпероксидазы.** Активность аскорбатпероксидазы определяли по снижению поглощения аскорбата при 290 нм модифицированным методом [28]. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции восстановленного аскорбата (2.8 $мМ^{-1} \cdot см^{-1}$) и выражали в мкМ аскорбата/мин · г сырой массы корней.

**Определение содержания аскорбата.** Для количественного определения восстановленного аскорбата к 200 мкл нейтрализованного экстракта приливали 100 мкл дистиллированной воды. Затем добавляли 200 мкл 10%-ной ТХУ, 200 мкл 44%-ной фосфорной кислоты, 200 мкл 4%-ного 2,2'-дипиридила и 100 мкл 3%-ного раствора $FeCl_3$. Контрольная проба вместо экстракта содержала разбавленный K–Na фосфатный буфер, pH 7.4, и была обработана так же, как и опытные. Все пробы инкубировали в течение 60 мин и затем измеряли их поглощение при 524 нм на спектрофотометре. Концентрацию аскорбата определяли, используя молярный коэффициент поглощения $\varepsilon = 8.7$ $мМ^{-1}$ $см^{-1}$ [29].

**Статистическая обработка результатов.** Опыты проводили в трехкратной биологической повторности и каждый воспроизводили независимо 3 раза. На рисунках и в таблице приведены средние величины и их стандартные отклонения ($M \pm \sigma$). Достоверность различий между вариантами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Обсуждаются различия, достоверные при $P \leq 0.05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения воздействия лектинов на активность аскорбатпероксидазы и содержание аскорбата в корнях проростков пшеницы в условиях абиотических стрессов время инкубации лектинов с корнями было ограничено 2 ч. Выбор концентраций лектинов, составляющие от 5 до 40 мкг/мл, и времени инкубации был основан на ранее полученных результатах.

Результаты показали, что при воздействии всех видов изучаемых стрессовых факторов происходило повышение активности аскорбатпероксидазы. При гипо-, гипертермическом воздействии и засолении активность фермента для обоих лектинов эпифитного Sp7 и эндофитного Sp245 штаммов максимально возрастала после 60 мин инкубации с корнями. При этом различными были эффективные концентрации лектинов. Во всех случаях для лектина *A. brasilense* Sp7 максимум был отмечен при концентрации 20 мкг/мл, а для *A. brasilense* Sp245 при 10 мкг/мл (табл. 1).

Комбинированное воздействие лектинов и $CoSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(CH_3COO)_2$, $CuSO_4$ также приводило к повышению ферментативной активности в корнях проростков. Для обоих лектинов максимальный эффект по отношению к активности фермента был отмечен после 30 мин инкубации с $Pb(CH_3COO)_2$ при концентрации лектина эпифитного штамма – 10 мкг/мл (170%) и эндофитного штамма – 5 мкг/мл (230%). При инкубации с другими солями активность фермента в присутствии обоих лектинов достигала максимального значения после 1 ч. Так, в присутствии $CoSO_4$ и $ZnSO_4$ оно наблюдалось при концентрации лектинов – 20 мкг/мл, а $CuSO_4$ – 10 мкг/мл (табл. 1).

В случае комбинированного воздействия лектина *A. brasilense* Sp7 и смоделированной засухи наибольшее повышение активности фермента было отмечено уже после 15 мин инкубации с корнями и концентрации лектина 20 мкг/мл. Для лектина эндофитного штамма максимальное повышение ферментативной активности было отмечено также после 15 мин инкубации при его концентрации 5 мкг/мл (табл. 1).

Проведенные исследования показали, что изучаемые лектины индуцировали повышение активности аскорбатпероксидазы в корнях проростков при всех видах изучаемых стрессов и полученные данные хорошо коррелировали с результатами определения содержания аскорбиновой кислоты.

При гипо-, гипертермии и засолении воздействие лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 приводило к одинаковому результату. Количество аскорбата максимально возрастало после

**Таблица 1.** Влияние лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на активность аскорбатпероксидазы в корнях проростков пшеницы при абиотических стрессах. Контроль – корни (100%)

| Концентрация лектина, мкг/мл | Время воздействия, мин | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 15 | | 30 | | 60 | | 120 | |
| | Sp7 | Sp245 | Sp7 | Sp245 | Sp7 | Sp245 | Sp7 | Sp245 |
| 5°C | | | | | | | | |
| 5 | 98 ± 2 | 96 ± 2 | 95 ± 3 | 130 ± 3 | 94 ± 3 | 130 ± 3 | 100 ± 3 | 130 ± 3 |
| 10 | 96 ± 3 | 98 ± 4 | 120 ± 4 | 165 ± 2 | 160 ± 4 | 250 ± 2 | 105 ± 4 | 150 ± 2 |
| 20 | 100 ± 3 | 98 ± 3 | 140 ± 2 | 180 ± 4 | 200 ± 2 | 180 ± 4 | 145 ± 2 | 110 ± 4 |
| 40 | 101 ± 2 | 100 ± 2 | 105 ± 3 | 101 ± 3 | 120 ± 3 | 101 ± 3 | 102 ± 3 | 101 ± 3 |
| 42°C | | | | | | | | |
| 5 | 95 ± 2 | 95 ± 2 | 94 ± 3 | 100 ± 3 | 94 ± 3 | 80 ± 3 | 94 ± 3 | 95 ± 3 |
| 10 | 100 ± 3 | 96 ± 4 | 105 ± 4 | 175 ± 2 | 100 ± 4 | 230 ± 2 | 100 ± 4 | 130 ± 2 |
| 20 | 102 ± 3 | 94 ± 3 | 150 ± 2 | 120 ± 4 | 180 ± 2 | 100 ± 4 | 115 ± 2 | 110 ± 4 |
| 40 | 91 ± 2 | 101 ± 2 | 97 ± 3 | 101 ± 3 | 95 ± 3 | 101 ± 3 | 95 ± 3 | 101 ± 3 |
| 1% NaCl | | | | | | | | |
| 5 | 102 ± 3 | 95 ± 3 | 100 ± 2 | 115 ± 3 | 110 ± 2 | 115 ± 3 | 110 ± 2 | 115 ± 3 |
| 10 | 96 ± 2 | 101 ± 2 | 105 ± 3 | 155 ± 4 | 140 ± 3 | 300 ± 4 | 110 ± 3 | 190 ± 4 |
| 20 | 101 ± 4 | 100 ± 4 | 125 ± 4 | 110 ± 4 | 270 ± 4 | 120 ± 4 | 170 ± 4 | 120 ± 4 |
| 40 | 100 ± 3 | 98 ± 2 | 105 ± 3 | 102 ± 3 | 120 ± 3 | 110 ± 3 | 120 ± 3 | 103 ± 3 |
| 5% сахароза | | | | | | | | |
| 5 | 102 ± 3 | 350 ± 3 | 96± 3 | 250 ± 3 | 100 ± 2 | 105 ± 3 | 101 ± 4 | 100 ± 3 |
| 10 | 180 ± 2 | 185 ± 2 | 150 ± 2 | 165 ± 2 | 105 ± 3 | 98 ± 4 | 97 ± 4 | 100 ± 3 |
| 20 | 310 ± 4 | 130 ± 4 | 210 ± 4 | 120 ± 4 | 98 ± 4 | 100 ± 4 | 102 ± 3 | 95 ± 2 |
| 40 | 120 ± 3 | 98 ± 2 | 120 ± 3 | 102 ± 2 | 100 ± 3 | 100 ± 3 | 100 ± 2 | 96 ± 3 |
| $CoSO_4$ | | | | | | | | |
| 5 | 101 ± 3 | 98 ± 3 | 105 ± 2 | 110 ± 3 | 110 ± 2 | 115 ± 3 | 95 ± 2 | 100 ± 3 |
| 10 | 96 ± 2 | 101 ± 2 | 110 ± 3 | 130 ± 4 | 140 ± 3 | 160 ± 4 | 105 ± 3 | 100 ± 4 |
| 20 | 100 ± 4 | 102 ± 4 | 135 ± 4 | 170 ± 4 | 170 ± 4 | 220 ± 4 | 110 ± 4 | 120 ± 4 |
| 40 | 100 ± 3 | 98 ± 2 | 105 ± 3 | 105 ± 3 | 120 ± 3 | 110 ± 3 | 102 ± 3 | 100 ± 3 |
| $ZnSO_4$ | | | | | | | | |
| 5 | 98 ± 2 | 98 ± 2 | 100 ± 3 | 95 ± 3 | 94 ± 3 | 80 ± 3 | 100 ± 3 | 96 ± 3 |
| 10 | 100 ± 3 | 100 ± 4 | 102 ± 4 | 114 ± 2 | 120 ± 4 | 115 ± 2 | 105 ± 4 | 100 ± 4 |
| 20 | 94 ± 3 | 98 ± 3 | 136 ± 2 | 170 ± 4 | 200 ± 2 | 210 ± 4 | 105 ± 3 | 120 ± 2 |
| 40 | 100 ± 2 | 100 ± 2 | 100 ± 3 | 103 ± 3 | 95 ± 3 | 101 ± 3 | 98 ± 2 | 98 ± 3 |
| $Pb(CH_3COO)_2$ | | | | | | | | |
| 5 | 120 ± 3 | 130 ± 3 | 130 ± 3 | 400 ± 3 | 105 ± 3 | 115 ± 3 | 100 ± 4 | 100 ± 3 |
| 10 | 160 ± 2 | 110 ± 2 | 350 ± 4 | 150 ± 4 | 140 ± 2 | 155 ± 2 | 100 ± 4 | 100 ± 3 |
| 20 | 130 ± 4 | 100 ± 4 | 185 ± 3 | 110 ± 2 | 105 ± 4 | 100 ± 4 | 104 ± 3 | 95 ± 2 |
| 40 | 100 ± 3 | 98 ± 2 | 98 ± 2 | 103 ± 3 | 100 ± 3 | 98 ± 2 | 106 ± 2 | 96 ± 3 |
| $CuSO_4$ | | | | | | | | |
| 5 | 102 ± 3 | 95 ± 3 | 105 ± 2 | 106 ± 3 | 110 ± 2 | 115 ± 3 | 102 ± 2 | 100 ± 3 |
| 10 | 96 ± 2 | 101 ± 2 | 130 ± 3 | 160 ± 4 | 180 ± 3 | 200 ± 4 | 120 ± 3 | 135 ± 4 |
| 20 | 101 ± 4 | 100 ± 4 | 110 ± 4 | 115 ± 4 | 170 ± 4 | 120 ± 4 | 110 ± 4 | 105 ± 4 |
| 40 | 100 ± 3 | 98 ± 2 | 100 ± 3 | 105 ± 3 | 120 ± 3 | 110 ± 3 | 100 ± 3 | 100 ± 3 |

60 мин инкубации с корнями. Однако эффективные концентрации лектинов оказались различными. Так, для лектина штамма Sp7 максимум был отмечен при концентрации 20 мкг/мл, а для Sp245 – 10 мкг/мл (рис. 1 и 2).

При комбинированном воздействии лектинов с солями тяжелых металлов также отмечалась тенденция к повышению содержания аскорбиновой кислоты в корнях проростков. Для обоих изучаемых лектинов при воздействии $CoSO_4$, $ZnSO_4$ и $CuSO_4$ наблюдалось наибольшее повышение после 1 ч инкубации с корнями и концентрации лектина 20 мкг/мл для $CoSO_4$ и $ZnSO_4$, 10 мкг/мл – для $CuSO_4$.

Наиболее максимальное воздействие лектинов по отношению к данному антиоксиданта бы-

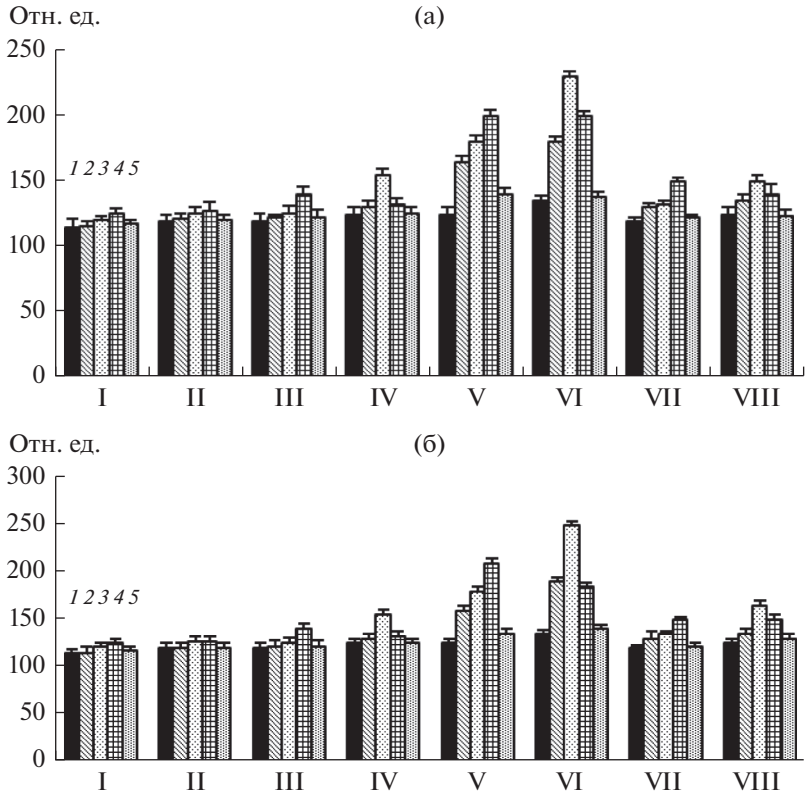


**Рис. 1.** Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 (I, III, V, VII) и Sp245 (II, IV, VI, VIII) на содержание, аскорбата в корнях проростков пшеницы при гипо- (а) и гипертермическом воздействии (б). *1* – контроль, корни (100%); *2* – 5 мкг/мл, *3* – 10 мкг/мл, *4* – 20 мкг/мл, *5* – 40 мкг/мл. I, II – время инкубации 15 мин, III, IV, – 30 мин; V, VI, – 60 мин; VII, VIII – 120 мин.

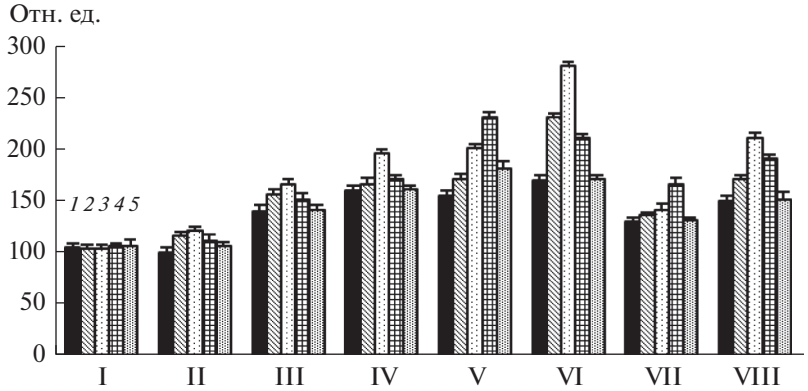


**Рис. 2.** Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 (I, III, V, VII) и Sp245 (II, IV, VI, VIII) на содержание, аскорбата в корнях проростков пшеницы при воздействии 1%-ного NaCl: *1* – контроль, корни (100%); *2* – 5, *3* – 10, *4* – 20, *5* – 40 мкг/мл. I, II – время инкубации 15 мин, III, IV, – 30 мин; V, VI, – 60 мин; VII, VIII – 120 мин.

ло отмечено в присутствии $Pb(CH_3COO)_2$. Для лектина *A. brasilense* Sp7 максимум достигался после 30 мин инкубации при его концентрации 10 мкг/мл. При этом количество аскорбата возрастало на 150%. Лектин *A. brasilense* Sp245 повышал количество аскорбата после 30 мин инкубации при самой низкой изучаемой его концентрации 5 мкг/мл. При этом величина прироста аскорбата намного превышали значение, которое наблюдалось в присутствии другого лектина, и составляло 210% (рис. 3).

Комбинированное воздействие лектинов и смоделированной засухи приводило к максимальному повышению содержания аскорбата в корнях проростков пшеницы уже через 15 мин инкубации. В случае с лектином *A. brasilense* Sp7 наибольшее повышение было отмечено при концентрации лектина 20 мкг/мл. Для лектина эндофитного

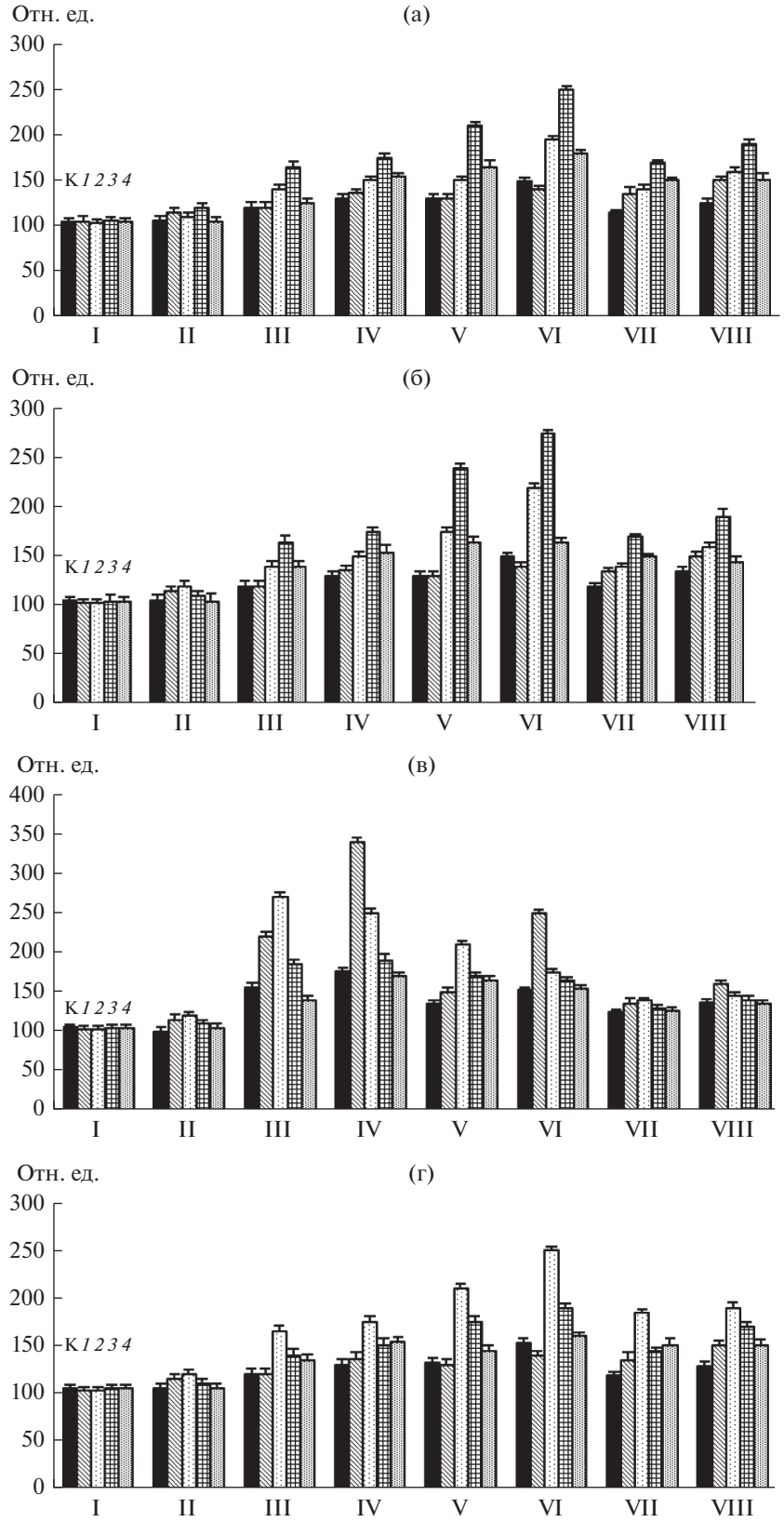


**Рис. 3.** Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 (I, III, V, VII) и Sp245 (II, IV, VI, VIII) на содержание аскорбата в корнях проростков пшеницы при воздействии $ZnSO_4$ (а), $CoSO_4$ (б), $Pb(CH_3COO)_2$ (в), $CuSO_4$ (г). К – контроль, корни (100%): *1* – 5, *2* – 10, *3* – 20, *4* – 40 мкг/мл. I, II – время инкубации 15 мин, III, IV, – 30 мин; V, VI, – 60 мин; VII, VIII – 120 мин.

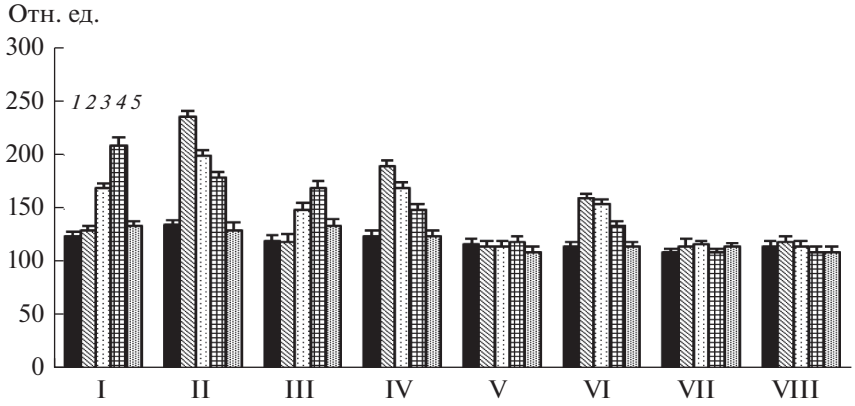


**Рис. 4.** Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 (I, III, V, VII) и Sp245 (II, IV, VI, VIII) на содержание, аскорбата в корнях проростков пшеницы при инкубировании на 5%-ной сахарозе: *1* – контроль, корни (100%); *2* – 5, *3* – 10, *4* – 20, *5* – 40 мкг/мл. I, II – время инкубации 15 мин, III, IV, – 30 мин; V, VI, – 60 мин; VII, VIII – 120 мин.

штамма максимальный эффект в отношении данных антиоксидантов был отмечен при концентрации 5 мкг/мл (рис. 4). В естественных условиях растения подвергаются действию постоянно меняющихся экологических факторов, активно реагируя на их отклонения от оптимума. Известно, что процесс адаптации растений к неблагоприятным условиям внешней среды происходит при активном участии антиоксидантной системы, контролирующей в клетках уровень активных форм кислорода (**АФК**) [22, 30]. Эффективность функционирования антиоксидантной системы обусловлена уровнями низкомолекулярных компонентов и активностью антиоксидантных ферментов.

Аскорбатпероксидаза принимает участие в регуляции метаболизма в ходе онтогенеза и имеет особое значение для растений в обеспечении быстрой приспособляемости к постоянно меняющимся условиям внешней среды. Функционирование аскорбатпероксидазы необходимо для детоксикации перекиси водорода в условиях окислительного стресса. В антиоксидантной защите значительная роль принадлежит и низкомолекулярным соединениям, в частности аскорбиновой кислоте, которая может нейтрализовать пероксид водорода непосредственно в реакции, катализируемой аскорбатпероксидазой, а также участвовать в обезвреживании радикальных АФК [29, 31].

В результате проведенных исследований показано, что лектины *A. brasilense* Sp7 и Sp245 оказывали существенное влияние на активность аскорбатпероксидазы и содержание аскорбата в начальный период влияния на растения при смоделированных абиотических стрессах. При этом динамика изменения активности фермента и содержания аскорбата имела аналогичную тенденцию. Повышение активности аскорбатпероксидазы во всех случаях происходило на фоне повышения содержания аскорбата и могло быть связано с активным использованием этого антиоксиданта в качестве субстрата в реакции, катализируемой этим ферментом.

В целом можно полагать, что лектины азоспирилл могут оказывать влияние на аскорбатзависимую составляющую антиоксидантной системы, задействованной в адаптивных реакциях проростков пшеницы на гипо, гипертермию, обезвоживание, засуху и воздействие тяжелыми металлами. Можно предположить, что при этом участие лектинов в адаптации растений к стрессу, вызванному тяжелыми металлами и засухой, более существенно.

Следует отметить, что во всех случаях лектины *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 обладали различной степенью активности, что согласуется с ранее полученными результатами [8, 19, 20, 32–34]. Причина различий в функциональной активности лектинов может быть объяснена различной углеводной специфичностью, структурными различиями белков, и как следствие, различным взаимодействием с поверхностью растительной клетки, что является определяющим фактором для включения последующих этапов.

Концентрационные различия, при которых лектины проявляли эффекты, вероятно, связаны с влиянием изучаемых неблагоприятных факторов на процесс связывания лектинов с рецепторами на корнях. Концентрационные зависимости могут способствовать возникновению высокой физиологической гетерогенности даже при небольших естественных вариациях концентрации. В связи с этим изучение концентрационных зависимостей достаточно актуально для понимания процессов, происходящих при адаптации растений к условиям окружающей среды, а также и при практическом использовании таких регуляторов роста, как лектины.

Полученные в работе результаты демонстрируют более широкий, чем считалось ранее, спектр влияния лектинов азоспирилл на метаболизм растения-хозяина и в сочетании с уже имеющимися знаниями (сведениями) позволят сформировать целостную картину взаимодействия бактерий с растениями на молекулярном уровне.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Sorty A.M, Meena K.K., Choudhary K., Bitla U.M., Minhas P.S., Krishnani K.K.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2016. V. 180. № 5. P. 872–882.
2. *Sahoo R.K., Ansari M.W., Pradhan M., Dangar T.K., Mohanty S., Tuteja N.* // Plant Signal Behav. 2014. V. 9. e29377.
3. *Arzanesh M.H., Alikhani H.A., Khavazi K., Rahimian H.A., Miransari M.* // Int. J. Bot. 2009. V. 5. № 3. P. 244–249.
4. *Pereyra M.A., Zalazar C.A., Barassia C.A.* // Plant Physiol. Biochem. 2006. V. 44. № 11–12. P. 873–879.
5. *Omar M.N.A., Osman M.E.H., Kasim W.A., Abd El-Daim I.A.* // Tasks Veg. Sci. 2009. V. 44. P. 133–147.
6. *Baldani J.I., Baldani V.L.D.* // An. Acad. Bras. Cienc. 2005. V. 77. № 3. P. 549–579.
7. *Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E.* // Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. P. 521–577.
8. *Alen'kina S.A., Payusova O.A., Nikitina V.E.* // Plant Soil. 2006. V. 283. № 1–2. P. 147–151.
9. *Schloter M., Wiehe W., Assmus B., Steindl H., Becke H., Hoftich G., Hartmann A.* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 5. P. 2038–2046.
10. *Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R., Hartmann A.* // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 3. P. 1013–1019.
11. *Антонюк Л.П., Евсеева Н.В.* // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 544–549.
12. *Шакирова Ф.М., Безрукова М.В.* // Журн. общей биологии. 2007. Т. 68. № 2. С. 98–114.
13. *Никитина В.Е., Аленькина С.А., Пономарева Е.Г., Савенкова Н.Н.* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 2. С. 165–170.
14. *Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y.* // Curr. Microbiol. 1998. V. 36. № 4. P. 241–244.
15. *Никитина В.Е., Пономарева Е.Г., Аленькина С.А.* Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Ред. В.В. Игнатова. М.: Наука, 2005. С. 70–97.
16. *Шелудько А.В., Пономарева Е.Г., Варшаломидзе О.Э., Ветчинкина Е.И., Кацы Е.И., Никитина В.Е.* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 6. С. 749–756.
17. *Никитина В.Е., Богомолова Н.В., Пономарева Е.Г., Соколов О.И.* // Известия РАН. Серия биологическая. 2004. Т. 31. № 4. С. 431–435.
18. *Чернышева М.П., Аленькина С.А., Никитина В.Е., Игнатов В.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 444–448.
19. *Аленькина С.А., Никитина В.Е.* // Микробиология. 2015. Т. 84. № 5. С. 553–560.
20. *Alen'kina S.A., Nikitina V.E.* // J. Plant Regul. 2017. V. 36. № 2. P. 522–527.
21. *Chen Z, Gallie D.* // Plant Physiol. 2005. V. 138. № 3. 1673–1689.
22. *Foyer Ch. H and Noctor G.* // Plant Physiology. 2011. V. 155. № 1. P. 2–18.
23. *Eltayeb S., Staal J.B., Kennes J., Lamberts H.G.P., de Bie R.A.* // BMC Musculoskeletal Disord. 2007. V. 8. P. 68–73.
24. *Foyer C.H., Noctor G.* // Plant Cell Environ. 2015. V. 38. № 2. P. 239–239.
25. *Echdat Y., Ofek I., Yachow-Yan Y., Sharon N., Mirelman D.* // Biochem. Biophis. Res. Commun. 1978. V. 85. № 4. P. 1551–1559.
26. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
27. *Грузнова К.А.* // Агрохимия. 2016. № 10. С. 89–93.
28. *Nakano Y., Asada K.* // Plant Cell Physiol. 1981. V. 22. № 5. P. 867–880.
29. *Bartoli C.G., Yu., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H.* // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 8. P. 1621–1631.
30. *Маевская С.Н., Николаева М.К.* // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 3. С. 351–359.
31. *Ranieri A., Castagna A., Soldatini G.F.* // J. Plant Physiol. 2000. V. 156. № 2. P. 266–271.
32. *Аленькина С.А., Матора Л.Ю., Никитина В.Е.* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 6. С. 856–858.
33. *Alen'kina S.A., Bogatyrev V.A., Matora L.Yu., Sokolova M.K., Chernysheva M.P., Trutneva K.A., Nikitina V.E.* // Plant Soil. 2014. V. 381. № 3. P. 337–349.
34. *Alen'kina S.A., Romanov N.I., Nikitina V.E.* // Braz. J. Bot. 2018. V. 41. № 3. P. 579–587.


# Effect of Azospirillum Lectins on Ascorbate Peroxidase Activity and Ascorbic Acid Content in Wheat Seedling Roots Exposed to Abiotic Stresses


**S. A. Alen'kina[a], * and V. E. Nikitina[a]**

[a] *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

**e-mail: alenkina_s@ibppm.ru*


Received July 30, 2019; revised October 10, 2019; accepted 1 November, 2019


We examined the effect of the lectins from two *Azospirillum* strains (the epiphyte *A. brasilense* Sp7 and the endophyte *A. brasilense* Sp245) on ascorbate peroxidase activity and ascorbic acid content in roots of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under simulated abiotic stresses – hypothermic (5°C) and hyperthermic (42°C) stress, salinity (1%NaCl), drought stress (5% sucrose), and heavy metal toxicity ($CoSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(CH_3COO)_2$, $CuSO_4$). Both lectins increased ascorbate peroxidase activity and ascorbate content in stressed seedling roots. On the basis of the obtained data, we propose that the antioxidant action of the *Azospirillum* lectins underlies the protective effect of these proteins toward wheat seedling roots subjected to abiotic stresses.


*Keywords:* associative nitrogen fixation, azospirillum, lectins, wheat roots, antioxidant system, ascorbate peroxidase, ascorbic acid, abiotic stresses

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 182–189

УДК 581.1:577.13

# УСИЛЕНИЕ ДОНОРОМ ОКСИДА АЗОТА ХОЛОДОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ И ОСМОПРОТЕКТОРНОЙ СИСТЕМ ЗЛАКОВ

© 2020 г. Ю. Е. Колупаев[1, *], Е. И. Горелова[1], Т. О. Ястреб[1], Н. И. Рябчун[2], А. М. Резник[2]

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

[2]Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, 61060 Украина

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

Поступила в редакцию 30.07.2019 г.
После доработки 10.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Исследовали влияние прайминга семян озимых ржи (*Secale cereale* L., сорт Память Худоерко) и пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала) донором оксида азота нитропруссидом натрия на их морозоустойчивость. Донор оксида азота (0.1–0.5 мМ) повышал способность проростков обоих злаков к холодовому закаливанию (6 сут при 2–4°С), вследствие этого значительно увеличивалось их выживание после промораживания при –6 и –8°С. Обработка семян нитропруссидом натрия способствовала повышению содержания в проростках злаков сахаров, пролина, антоцианов и флавоноидов, поглощающих в УФ-В. В них также наблюдали увеличение активности супероксиддисмутазы и гваяколпероксидазы. После холодового закаливания и особенно после промораживания содержание малонового диальдегида (продукта пероксидного окисления липидов) в проростках, выращенных из семян, праймированных нитропруссидом натрия, было ниже, чем в соответствующих контролях. Сделано заключение об усилении оксидом азота холодоиндуцированной активации антиоксидантной и осмопротекторной систем злаков.

*Ключевые слова:* оксид азота, прайминг, низкомолекулярные антиоксиданты, антиоксидантные ферменты, морозоустойчивость, озимые злаки

**DOI:** 10.31857/S0555109920020099

В последние десятилетия для повышения устойчивости растений к действию стресс-факторов различной природы наряду с подходами классической селекции и генетической инженерии все большую популярность приобретает прием предстрессовой обработки соединениями, индуцирующими протекторные системы. Такой подход получил название “прайминг” (priming). Прайминг вызывает эффекты, похожие во многом на естественные процессы закаливания растений, позволяющие им адаптироваться к экстремальным температурам и другим неблагоприятным факторам [1]. После воздействия праймирующих соединений растение оказывается в состоянии, при котором активация защитных реакций на действие стресс-факторов происходит быстрее и (или) проявляется более заметно, чем у не праймированных растений [2]. Механизмы этих явлений понятны еще не полностью, однако в целом они обусловлены предшествующей действию стрессора активацией сигнальной сети.

Оксид азота (**NO**) относится к наиболее изученным молекулам-газотрансмиттерам у растений [3, 4]. К настоящему времени накоплен большой объем сведений о его роли в гормональной регуляции, формировании цитоскелета, процессах прорастания семян, деэтиоляции и ризогенеза [3, 5, 6], а также во взаимодействии растений с симбионтами [7] и патогенами [8]. Особая роль отводится участию NO в процессах адаптации растений к неблагоприятным условиям среды [6, 9]. Однако его значение для адаптации растений к действию холода остается малоизученным, хотя при действии низких температур в органах растений ряда видов (*Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Citrus aurantium*, *Brassica raniflora*, *Triticum aestivum*) зарегистрировано повышение содержания NO [6, 10–12].

Положительное влияние NO на холодоустойчивость растений может быть связано с S-нитрозилированием целевых белков. Так, у *Brassica juncea* обнаружен эффект дифференцированного S-нитрозилирования 10 белков, среди которых и антиоксидантные ферменты – дегидроаскорбатредуктаза и глутатион-S-трансфераза [13]. Также показано повышение активности супероксиддис-

мутазы (**СОД**) и аскорбатпероксидазы вследствие S-нитрозилирования [10].

В некоторых исследованиях показано положительное влияние экзогенного NO на устойчивость растений к гипотермии. Обработка растений бермудской травы (*Cynodon dactylon*) донором NO нитропруссидом натрия (**НПН**) снижала вызываемые холодом (4°C) выход электролитов из тканей и повышение в клетках содержания малонового диальдегида (**МДА**) – продукта пероксидного окисления липидов (**ПОЛ**) [14]. При этом у растений, обработанных НПН, отмечались более высокие величины активности СОД, пероксидазы и каталазы, а также усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов. Фолиарная обработка молодых растений яровой пшеницы 0.1 мМ НПН способствовала их адаптации к трехдневному действию низкой положительной температуры (2–5°C), что выражалось в уменьшении проявления индуцируемого холодом окислительного стресса и повышении активности СОД, каталазы и пероксидазы [15]. Показано, что замачивание семян яровой пшеницы в 0.1 мМ растворах НПН способствовало сохранению близких к нормальным показателей роста и водного режима у растений, подвергнутых действию 4°C в течение 6 ч [16].

В то же время практически неисследованным остается значение NO для устойчивости растений к действию отрицательных температур. Известно, что формирование их морозоустойчивости происходит в процессе достаточно длительного действия на них низких положительных температур и включает в себя глубокие перестройки метаболизма [17]. Среди них большое значение имеют накопление криопротекторов и активация антиоксидантной защитной системы, которая предотвращает вторичные окислительные повреждения [18]. Влияние NO на эти процессы у морозоустойчивых злаков до настоящего времени не исследовалось.

Цель работы – изучение влияния прайминга семян озимых ржи (*Secale cereale* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) донором NO НПН на формирование их морозоустойчивости и связи этого процесса с накоплением низкомолекулярных протекторов и модификацией ферментативной антиоксидантной системы.

## МЕТОДИКА

В работе использовали этиолированные проростки озимых ржи сорта Память Худоерко и пшеницы сорта Досконала. Несмотря на биологическое сходство, у этих видов злаков проявляются заметные различия по морозоустойчивости. Проростки ржи, в отличие от пшеницы, обладают определенным уровнем конститутивной морозоустойчивости, а после закаливания у них формируется больший уровень резистентности к отрицательным температурам [18].

Семена в течение 40 мин обеззараживали в 6%-ном растворе пероксида водорода и тщательно промывали дистиллированной водой. После этого семена опытных вариантов праймировали донором NO путем погружения на 1 ч в растворы 0.1–2 мМ НПН [16], а семена контрольного варианта выдерживали 1 ч в дистиллированной воде. В отдельных сериях опытов в качестве дополнительного контроля использовали так называемый раствор “истощенного” НПН, содержащий продукты разложения этого соединения, но утративший NO [8], который получали путем выдерживания раствора НПН в открытой посуде на свету в течение 2 сут.

Семена проращивали в течение 4 сут в темноте при 20–22°C на фильтровальной бумаге, смоченной очищенной водопроводной водой. Через 4 сут этиолированные проростки использовали для биохимических анализов и подвергали промораживанию в течение 5 ч в камере (“Danfoss”, Нидерланды) в отсутствие света при –6°C, снижая температуру со скоростью 1°C/ч. Для оттаивания проростков температуру в камере повышали до 2°C со скоростью 1°C/ч. После этого проростки продолжали выращивать в течение 3 сут при 20–22°C и освещенности 6 клк и оценивали их выживание.

В вариантах с холодовым закаливанием 3-суточные этиолированные проростки помещали на 6 сут в холодильную камеру (без освещения) при 2–4°C. Оптимальный режим закаливания проростков был выбран на основании результатов экспериментов, описанных в предыдущей работе [18]. В качестве контроля использовали 4-суточные этиолированные проростки, не подвергавшиеся закаливанию. Поскольку при низкой температуре развитие проростков замедлялось, 9-суточные закаленные растения были такими же, как 4-суточные контрольные, выращенные при 20–22°C.

После закаливания проростки подвергали промораживанию в течение 5 ч в отсутствие света при –6 или –8°C, снижая температуру со скоростью 1°C/ч. Затем образцы оттаивали и продолжали выращивать на свету для оценки выживания, как описано выше.

Суммарное содержание сахаров в проростках анализировали методом Морриса–Роэ с использованием антронового реактива с модификациями, описанными ранее [18], и выражали в мг/г сухой массы. Содержание пролина определяли с использованием нингидринового реактива [19], выражая в мкмоль/г сухой массы. Содержание продуктов ПОЛ (преимущественно МДА) в проростках определяли с использованием 2-тиобарбитуровой кислоты [18].

**Таблица 1.** Влияние праймирования семян НПН на выживание (%) проростков ржи и пшеницы после 5-часового промораживания при –6 и –8°С

| Вариант | Промораживание незакаленных проростков (5 ч при –6°С) | Промораживание закаленных проростков (5 ч при –6°С) | Промораживание закаленных проростков (5 ч при –8°С) |
|---|---|---|---|
| | *Secale cereale* | | |
| Контроль | 23.4 ± 2.0 | 48.2 ± 3.0 | 40.6 ± 2.8 |
| НПН (0.1 мМ) | 24.7 ± 2.3 | 64.8 ± 2.4 | 55.2 ± 2.6 |
| НПН (0.2 мМ) | 27.2 ± 1.8 | 71.6 ± 2.6 | 60.6 ± 2.2 |
| НПН (0.5 мМ) | 25.9 ± 2.1 | 59.1 ± 3.1 | 51.6 ± 2.8 |
| НПН (2.0 мМ) | 23.2 ± 1.8 | 43.3 ± 3.3 | 46.2 ± 3.0 |
| | *Triticum aestivum* | | |
| Контроль | 0 | 34.2 ± 2.8 | 19.6 ± 2.4 |
| НПН (0.1 мМ) | 0 | 58.8 ± 3.2 | 34.9 ± 2.7 |
| НПН (0.2 мМ) | 0 | 59.6 ± 3.4 | 35.8 ± 2.9 |
| НПН (0.5 мМ) | 0 | 41.3 ± 2.7 | 26.3 ± 2.8 |
| НПН (2.0 мМ) | 0 | 31.7 ± 2.9 | 24.2 ± 2.6 |

Для определения содержания антоцианов и бесцветных флавоноидов, имеющих максимум поглощения в области УФ-В, навески побегов гомогенизировали в 1%-ном растворе HCl в метаноле. После центрифугирования гомогената на центрифуге MPW 350R (“MedInstruments”, Польша) при 8000 g в течение 15 мин определяли оптическую плотность супернатанта при 300 и 530 нм [20]. Содержание антоцианов и бесцветных флавоноидов выражали в условных единицах как величины $A_{530}$/г сухой массы и $A_{300}$/г сухой массы соответственно.

Активность антиоксидантных ферментов СОД (КФ 1.15.1.1), каталазы (КФ 1.11.1.6) и гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по методикам, описанным ранее [18, 21]. Навески проростков гомогенизировали при 2–4°С в 0.15 М K, Na-фосфатном буфере, pH 7.6, содержащем ЭДТА (0.1 мМ) и дитиотреитол (1 мМ). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 2–4°С. Активность СОД определяли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анион-радикалы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы оценивали по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, а в качестве субстрата – пероксид водорода. Активность СОД и гваяколпероксидазы выражали в усл. ед./(г сухой массы × мин), активность каталазы – в ммоль $H_2O_2$/(г сухой массы × мин).

Биологическая повторность опытов трехкратная. В таблице и на рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. За исключением случаев, которые в тексте указаны специально, обсуждались различия, достоверные при $P \leq 0.05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Незакаленные проростки ржи частично выживали после 5-часового промораживания при –6°С, в то время как проростки пшеницы не проявляли базовой морозоустойчивости и полностью погибали после криостресса (табл. 1), что согласовывалось с результатами, полученными ранее для других сортов [18]. Прайминг семян НПН почти не влиял на устойчивость незакаленных проростков к промораживанию. Можно отметить лишь тенденцию к небольшому повышению выживания проростков ржи после их обработки 0.2 мМ НПН (табл. 1).

После 6-суточного холодового закаливания проростки обоих злаков приобретали свойство морозоустойчивости: они частично выживали после действия низких температур (–6 и –8°С). При этом морозоустойчивость проростков ржи была существенно выше, чем пшеницы (табл. 1).

Прайминг семян 0.1–0.5 мМ НПН вызывал повышение морозоустойчивости обоих злаков. Наиболее существенное положительное влияние оказывала обработка семян 0.2 мМ раствором НПН (табл. 1). Такая закономерность проявлялась при промораживании проростков как при –6, так и –8°С. Для доказательства специфичности действия НПН в качестве донора NO сравнивали влияние на морозоустойчивость прайминга семян свежеприготовленным и “истощенным” НПН. Обработка семян ржи и пшеницы продуктами светоиндуцированного разложения НПН не оказывала достоверного влияния на морозоустойчивость проростков (рис. 1), что давало основания связы-

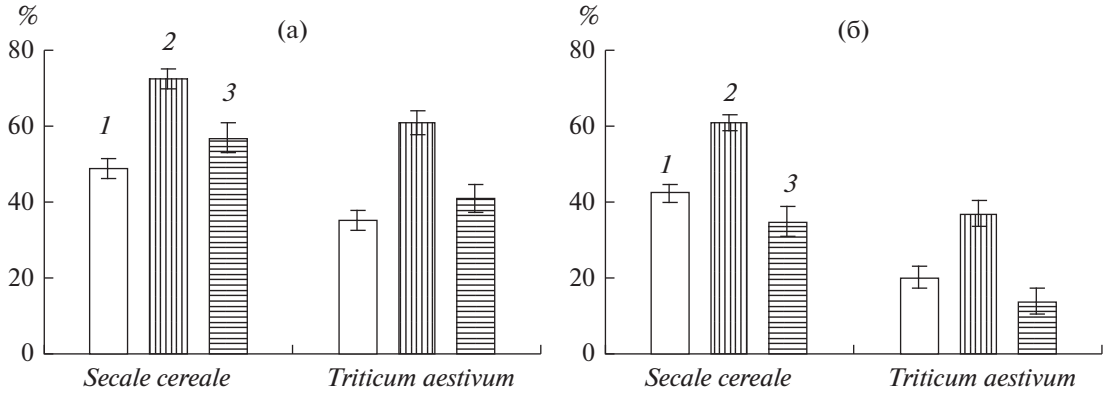


**Рис. 1.** Сравнение влияния свежеприготовленного и “истощенного” НПН на выживание (%) закаленных проростков ржи и пшеницы после промораживания в течение 5 ч при –6°С (а) и –8°С (б). *1* – контроль; *2* – НПН (0.2 мМ); *3* – “истощенный” НПН (0.2 мМ).

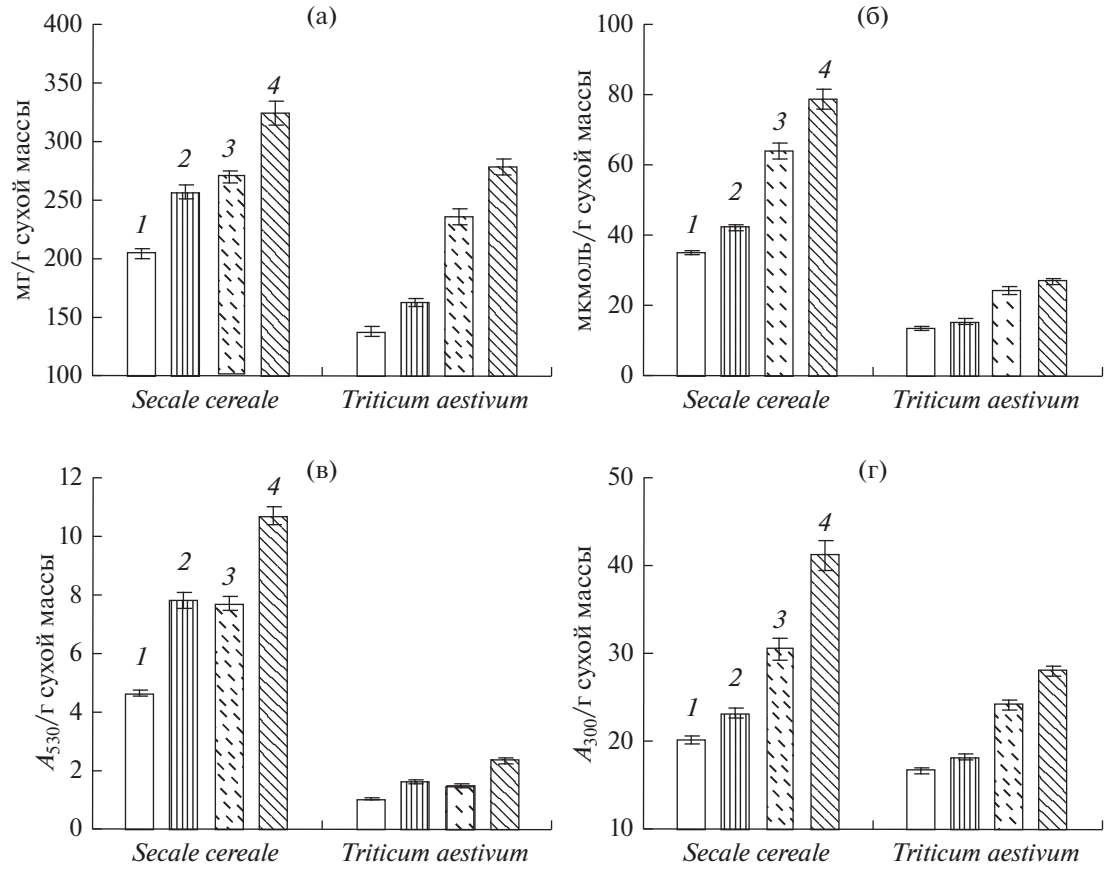


**Рис. 2.** Содержание сахаров (а), пролина (б), антоцианов (в) и “бесцветных” флавоноидов (г) в проростках ржи и пшеницы при действии НПН и холодового закаливания (6 сут при 2–4°С). *1* – контроль; *2* – НПН (0.2 мМ); *3* – закаливание; *4* – НПН (0.2 мМ) + закаливание.

вать наблюдаемые эффекты НПН с его действием как донора NO, а не соли.

Незакаленные проростки ржи содержали большее количество сахаров по сравнению с проростками пшеницы (рис. 2а). В отсутствие низкотемпературного закаливания обработка семян НПН вызывала некоторое повышение содержания сахаров в проростках обоих злаков. Закаливание приводило к более существенному увеличению количества растворимых углеводов. При этом прайминг 0.2 мМ НПН способствовал накоплению большего количества сахаров при закаливании проростков злаков обоих видов (рис. 2а).

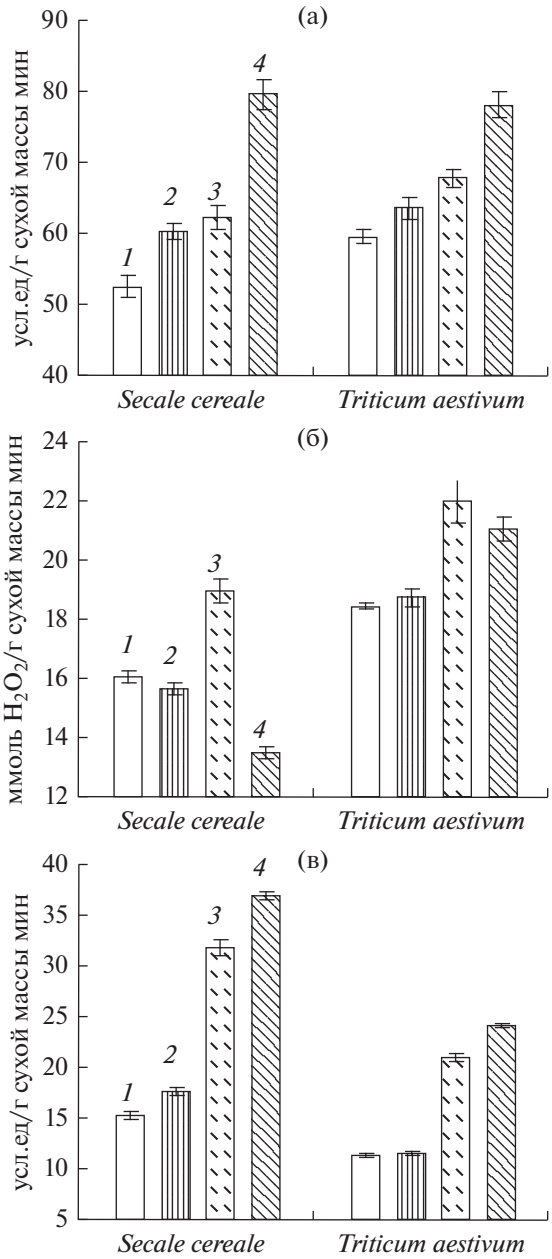


**Рис. 3.** Активность СОД (а), каталазы (б) и гваяколпероксидазы (в) в проростках ржи и пшеницы при действии НПН и холодового закаливания (6 сут при 2–4°С). *1* – контроль; *2* – НПН (0.2 мМ); *3* – закаливание; *4* – НПН (0.2 мМ) + закаливание.

Содержание пролина в незакаленных проростках ржи было выше, чем в проростках пшеницы приблизительно в 2.7 раза (рис. 2б). В отсутствие низкотемпературного закаливания обработка НПН вызывала достоверное увеличение его содержания только у проростков ржи. Под влиянием низкотемпературного закаливания у обоих злаков происходило почти двукратное повышение содержания пролина. При этом прайминг семян донором NO вызывал дополнительное существенное накопление пролина при закаливании проростков ржи, а у проростков пшеницы такой эффект проявлялся лишь на уровне тенденции (рис. 2б).

Содержание антоцианов в контрольных проростках ржи было в 4.5 раза выше, чем в проростках пшеницы (рис. 2в). Обработка семян НПН при росте проростков в обычных температурных условиях вызывала заметное повышение их количества у обоих видов, однако абсолютные величины у ржи были намного больше. Под влиянием закаливания также происходило накопление антоцианов в проростках ржи и пшеницы. Прайминг НПН усиливал этот эффект у обоих злаков, при этом абсолютная величина содержания антоцианов у ржи существенно превышала таковую у пшеницы (рис. 2в).

В обычных температурных условиях количество флавоноидов, поглощающих в УФ-В, несколько увеличивалось у проростков обоих злаков под влиянием прайминга семян донором NO (рис. 2г). После закаливания их содержание при отсутствии прайминга существенно повышалось у обоих злаков. Предобработка НПН вызывала дополнительное накопление флавоноидов, при этом более заметным оно было у проростков ржи (рис. 2г).

Активность СОД у проростков пшеницы в контроле оказалась выше, чем у ржи (рис. 3а). Прайминг НПН в отсутствие холодового закаливания вызывал достоверное повышение активности фермента только у проростков ржи, а после холодового закаливания она повышалась в проростках обоих видов. При этом прайминг семян НПН способствовал увеличению активности фермента, как в проростках ржи, так и пшеницы (рис. 3а).

Активность каталазы, как и СОД, в контроле была более высокой у проростков пшеницы (рис. 3б). Холодовое закаливание вызывало повышение активности этого фермента у проростков и ржи, и пшеницы. Обработка семян НПН в обычных условиях существенно не влияла на активность каталазы в проростках обоих видов. В то же время после закаливания в проростках ржи, выращенных из семян, праймированных донором NO, отмечались более низкие значения ее активности (рис. 3б).

Конститутивная активность гваяколпероксидазы в проростках ржи была выше, чем в проростках пшеницы (рис. 3в). В отсутствие холодового закаливания прайминг семян НПН не оказывал существенного влияния на активность этого фермента у обоих видов злаков. Под влиянием закаливания активность гваяколпероксидазы существенно увеличивалась как у ржи, так и у пшеницы. При этом обработка семян донором NO способствовала повышению ее активности у обоих видов.

Под влиянием прайминга НПН в проростках ржи и пшеницы в обычных температурных условиях уменьшалось содержание продукта ПОЛ МДА (рис. 4). Похожий эффект вызывало и низкотемпературное закаливание. При этом в проростках обоих видов, выращенных из семян, обработанных донором NO, отмечались наименьшие величины содержания МДА.

После промораживания содержание МДА в проростках увеличивалось, но особенно заметно это проявлялось у менее морозоустойчивой пшеницы. Праймирование семян НПН заметно уменьшало проявление такого эффекта окислительного стресса у обоих злаков (рис. 4).

В целом, полученные результаты свидетельствовали о положительном влиянии донора NO на формирование морозоустойчивости озимых злаков. Такой эффект в значительной степени связан с накоплением низкомолекулярных полифункциональных протекторов (сахаров, пролина и антоцианов) и отчасти с активацией ферментативной антиоксидантной системы (рис. 2, 3). Об этом свидетельствовало менее выраженное проявление окислительных повреждений после промораживания проростков ржи и пшеницы, выращенных из семян, праймированных НПН (рис. 4).

Следует отметить, что рожь и пшеница заметно различались по вкладу отдельных компонентов антиоксидантной и осмопротекторной систем в формирование устойчивости к криострессу [18]. Так, в условиях данных экспериментов для проростков более морозоустойчивой ржи был характерен достаточно высокий базовый уровень содержания пролина, антоцианов и бесцветных флавоноидов, а также активности гваяколпероксидазы (рис. 2, 3). При этом холодовое закаливание вызвало повышение этих показателей. Прайминг НПН способствовал накоплению пролина у проростков ржи, но не пшеницы как при обычной, так и (в большей степени) при закаливающей температуре (рис. 2б). Влияние донора NO на содержание флавоноидов также более заметно проявлялось у проростков ржи (рис. 2г). В то же время прайминг НПН вызывал увеличение содержания антоцианов и сахаров у обоих злаков, причем как на фоне закаливания, так и в обычных условиях (рис. 2).

Антоцианы обладают высокой антиоксидантной активностью [22]. Они, наряду с другими флавоноидными соединениями, проявляют полифункциональное защитное действие в растительных клетках, составляющими которого являются их осмопротекторные эффекты, способность связывать тяжелые металлы и пр. [23]. Методами биоинформатики показано, что NO задействован в регуляции экспрессии генов, контролирующих синтез флавоноидов, в том числе антоцианов [24]. Полученные результаты согласовывались с такими представлениями.

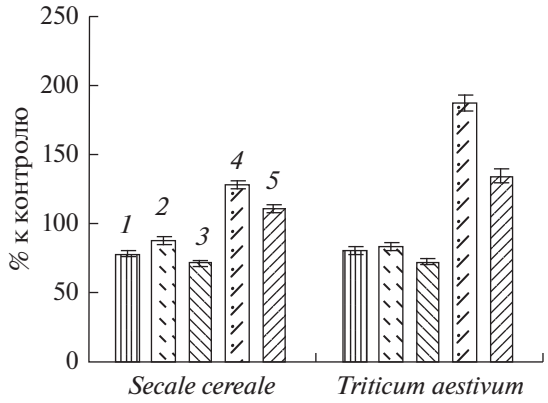


**Рис. 4.** Содержание МДА (% к контролю) в проростках ржи и пшеницы при действии НПН, холодового закаливания (6 сут при 2–4°C) и промораживания (5 ч при –6°C). *1* – НПН (0.2 мМ); *2* – закаливание; *3* – НПН (0.2 мМ) + закаливание; *4* – закаливание + + промораживание; *5* – НПН (0.2 мМ) + закаливание + промораживание.

Другой составляющей положительного влияния прайминга семян на морозоустойчивость проростков злаков донором NO, по-видимому, являлось усиление накопления пролина. Установлено, что холод-индуцированная экспрессия гена $\Delta^1$-пирролин-5-карбоксилатсинтазы и накопление пролина у арабидопсиса происходят с участием NO [25]. У злаков, по-видимому, также возможно индуцирование синтеза пролина под действием NO (рис. 2б). Можно предположить, что пределы накопления пролина при экзогенных воздействиях лимитируются видовыми генотипическими особенностями. Так, в условиях холодового закаливания усиление накопления пролина в варианте с праймингом донором NO было существенным у ржи и почти не проявлялось у проростков пшеницы. В то же время ранее было показано, что при фолиарной обработке взрослых растений пшеницы донор NO НПН в зависимости от концентрации может, как усиливать, так и ослаблять проявление индуцированного засухой накопления пролина в листьях [21].

В растительных клетках сахара считаются одними из главных криопротекторов [17]. Прайминг семян обоих видов злаков НПН способствовал их накоплению, причем как на фоне холодового закаливания, так и при обычной температуре (рис. 2а). В литературе мало сведений о влиянии NO на содержание растворимых углеводов у растений. Однако показано, что при фолиарной обработке растений ячменя НПН в условиях засухи повышается содержание сахаров в листьях [6]. Можно предположить, что при стрессах, сопровождающихся осмотическими эффектами (криостресс и засуха),

сахара выполняют множественные функции, связанные как с повышением водоудерживающей способности, так и со стабилизацией мембран и антиоксидантной защитой [17, 26].

Феномены сложного (как положительного, так и отрицательного) влияния NO на активность антиоксидантных ферментов описаны в многочисленных работах (например, в обзорах [8, 27]). Однако в условиях описанных экспериментов влияние прайминга семян злаков на активность антиоксидантных ферментов было менее заметным по сравнению с его действием на содержание низкомолекулярных протекторов. Тем не менее, следует отметить заметное увеличение активности СОД под влиянием НПН у проростков обоих видов злаков при холодовом закаливании (рис. 3а).

Известны данные о возможности регуляции NO активности СОД не только на генетическом уровне, но также путем посттрансляционных модификаций. Предполагается, что обратимое нитрозилирование может быть одним из механизмов изменения активности Cu/Zn-СОД [27]. Однако в клетках сладкого картофеля при обработке НПН наблюдали усиление экспрессии гена Cu/Zn-SOD [28]. На изолированных листьях кукурузы получены данные, свидетельствующие о регуляции NO активности СОД с участием многих компонентов сигнальной сети и экспрессии соответствующих генов, о чем свидетельствует снятие его эффекта ингибиторами MAP-киназ (от **MAP** – mitogen-activated protein kinase) [29].

Наряду с активностью СОД в проростках пшеницы и ржи, выращенных из семян, праймированных донором NO, увеличение активности гваяколпероксидазы при холодовом закаливании было более существенным, чем в вариантах без обработки (рис. 3в). В условиях *in vitro* показана способность NO к связыванию с гемом пероксидаз [27]. Такой эффект может сопровождаться ингибированием активности фермента. NO *in vivo* может вызывать активацию экспрессии генов, кодирующих пероксидазы [29]. Можно предположить, что этим обусловлены описанные эффекты повышения активности разных форм пероксидаз при обработке растений донорами NO, в том числе при низкотемпературном стрессе [14, 15]. Примечательно, что в условиях описанных выше экспериментов прайминг НПН вызывал снижение активности другого гемсодержащего фермента – каталазы (рис. 3б). Однако такой эффект четко проявлялся только у проростков ржи, причем на фоне холодового закаливания. В связи с этим представляется маловероятным прямое ингибирование фермента за счет связывания NO с гемовым активным центром [27]. Можно предположить, что снижение активности каталазы у проростков ржи, выращенных из семян, праймированных НПН, связано с регуляторными процессами, например, большим вкладом в обезвреживание АФК других компонентов антиоксидантной системы, в частности, пероксидазы и низкомолекулярных антиоксидантов.

Таким образом, в настоящей работе показан феномен усиления донором NO эффекта низкотемпературного закаливания проростков злаков, приводящий к повышению их морозоустойчивости. Его биохимическими составляющими являлись в первую очередь усиление накопления низкомолекулярных полифункциональных протекторов (сахаров, пролина и флавоноидных соединений) и отчасти повышение активности антиоксидантных ферментов (СОД и гваяколпероксидазы). Вполне естественно, что обработка экзогенным NO могла способствовать и активации других протекторных систем. Например, у растений арабидопсиса показана зависимость от NO-статуса экспрессии таких специфических холод-чувствительных генов как *CBF1*, *CBF2*, *CBF3*, *LTI30*, *LTI78* и *COR15a* [10, 11]. Экспрессия гена протеинкиназы CPK27 при холодовой акклимации томата оказалась зависимой от NO [30]. В целом NO, по-видимому, можно рассматривать в качестве агента, активирующего криозащитные механизмы. Однако такая активация, по крайней мере, в рамках исследуемой модели, четко проявлялась только на фоне действия низкой закаливающей температуры. Можно предположить, что активация ключевых механизмов, связанных с экспрессией генов и обусловливающих развитие морозоустойчивости, запускается действием низких положительных температур, а NO, наряду с другими компонентами сигналинга, участвует в обеспечении этого процесса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Savvides A., Ali S., Tester M., Fotopoulos V.* // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. № 4. P. 329–340.
2. *Filippou P., Tanou G., Fotopoulos V.* // Plant Acclimation to Environmental Stress. / Eds. Tuteja N., Singh Gill S. N.Y.: Springer, 2013. P. 1–27.
3. *Wilson I.D., Neill S.J. Hancock J.T.* // Plant Cell Environ. 2008. V. 31. № 5. P. 622–631.
4. *Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P.* // Cytol. Genet. 2015. V. 49. № 5. P. 338–348.
5. *Масленникова Д.Р., Аллагулова Ч.Р., Федорова К.А., Плотников А.А., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М.* // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 5. С. 355–362.
6. *Yemets A.I., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Blume Ya.B.* // Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms. V. 2 / Eds. Hasanuzzaman M., Fotopoulos V., Nahar K., Fujita M. John Wiley & Sons Ltd., 2019. P. 873–922. https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch39
7. *Глянько А.К., Васильева Г.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 21–28.

8. *Мамаева А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Мошков И.Е., Мур Л.А.Дж., Холл М.А., Новикова Г.В.* // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 4. С. 459–474.
9. *Khan M.N., Mohammad F., Mobin M., Ali Saqib M.* // Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology. / Eds. Khan M.N., Mobin M., Mohammad F., Corpas F. Switzerland: Springer Intern. Pub., 2014. P. 225–242.
10. *Puyaubert J., Baudouin E.* // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. № 12. P. 2623–2630.
11. *Baudouin E., Jeandroz S.* // Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants / Eds. Khan M.N., Mobin M., Mohammad F., Corpas F. Switzerland: Springer Intern. Pub., 2015. P. 129–139.
12. *Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J.* // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. № 4. P. 462–472.
13. *Sehrawat A., Deswal R.* // J. Proteome Res. 2014. V. 13. № 5. P. 2599–2619.
14. *Fan J., Chen K., Amombo E., Hu Z., Chen L., Fu J.* // Plos ONE. 2015. V. 10. № 7. e0132991.
15. *Esim N., Atici Ö.* // Front. Life Sci. 2015. V. 8. № 2. P. 124–130.
16. *Bibi A., Majid S.A., Ulfat A., Khatoon S., Munir A., Javed G.* // J. Animal Plant Sci. 2017. V. 27. № 1. P. 186–191.
17. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс: 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
18. *Колупаев Ю.Е., Рябчун Н.И., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И.* // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 4. С. 533–541.
19. *Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D.* // Plant Soil. 1973. V. 39. № 1. P. 205–210.
20. *Ястреб Т.О., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Дмитриев А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 223–229.
21. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Луговая А.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 400–407.
22. *Neill S.O., Gould K.S.* // Funct. Plant Biol. 2003. V. 30. № 8. P. 865–873
23. *Khlestkina E.K.* // Cereal Res. Commun. 2013. V. 41. № 2. P. 185–198
24. *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.
25. *Zhao M.G., Chen L., Zhang L.L., Zhang W.H.* // Plant Physiol. 2009. V. 151. № 2. P. 755–767.
26. *Ramel F., Sulmon C., Bogard M., Couée I., Gouesbet G.* // BMC Plant Biol. 2009. V. 9. P. 28
27. *Arora D., Jain P., Singh N., Kaur H., Bhatla S.C.* // Free Radical Res. 2016. V. 50. № 3. P. 291–303.
28. *Lin C.C., Jih P.J., Lin H.H., Lin J.S., Chang L.L., Shen Y.H., Jeng S.T.* // Plant Mol. Biol. 2011. V. 77. № 3. P. 235–249.
29. *Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J. Ding H., Xu S., Hu X., Tan M.* // New Phytol. 2007. V. 175. № 1. P. 36–50.
30. *Lv X., Li H., Chen X., Xiang X., Guo Z., Yu J., Zhou Y.* // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. № 16. P. 4127–4139.

# Nitrogen Oxide Donor Enhances Cold-Induced Changes in Antioxidant and Osmoprotective Systems of Cereals

**Yu. E. Kolupaev[a], *, E. I. Horielova[a], T. O. Yastreb[a], N. I. Ryabchun[b], and A. M. Reznik[b]**

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

[b] *Yur'ev Institute of Plant Breeding, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv, 61060 Ukraine*

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

Received July 30, 2019; revised October 10, 2019; accepted 1 November, 2019

The effect of priming seeds of winter rye (*Secale cereale* L., var. Pamiat' Khudoerko) and wheat (*Triticum aestivum* L., var. Dosconala) with nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (**SNP**) on their frost resistance was investigated. The NO donor at concentrations of 0.1–0.5 mM increased the cold-hardening ability of the seedlings of both cereals (6 days at 2–4°C), as a result of which their survival after freezing at –6 and –8°C significantly increased. Seed treatment with SNP contributed to an increase in cereal seedlings in the content of sugars, proline, anthocyanins, and flavonoids absorbing in UV-B. An increase in the activity of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase also noted there. After cold hardening, and especially after freezing, the content of the lipid peroxidation product malonic dialdehyde in seedlings grown from seeds primed with SNP was lower than in the corresponding controls. It was concluded that nitrogen oxide enhanced the cold-induced activation of antioxidant and osmoprotective systems of cereals.

*Keywords:* nitrogen oxide, priming, low-molecular-weight antioxidants, antioxidant enzymes, frost resistance, winter cereals

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 190–197

УДК 579.61:616-002

# АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА МЫШЕЙ

**© 2020 г. О. В. Калмантаева[1, *], В. В. Фирстова[1], Н. С. Грищенко[1], Т. И. Рудницкая[1], В. Д. Потапов [1], С. Г. Игнатов[1]**

[1]*"Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии" Роспотребнадзора, Оболенск, Московская обл., 142279 Россия*

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

Поступила в редакцию 16.09.2019 г.
После доработки 10.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Исследовали антибактериальную активность наночастиц серебра размером 43.6 ± 10.7 нм в отношении штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в экспериментах *in vitro* (изученные концентрации наночастиц 0.1, 1.0, 10, 25 и 50 мкг/мл) и на экспериментальной мышиной модели хронического туберкулеза. Показано, что наночастицы серебра в концентрации 50 мкг/мл подавляли рост микобактерий *in vitro* в 2 раза. Ингаляционное введение наночастиц серебра в дозе 0.1 мг/кг мышам, больным туберкулезом, приводило к снижению обсемененности легких и селезенок *M. tuberculosis* на 2 порядка. У этих животных снижалось количество белка в жидкости бронхо-легочного лаважа в 2 раза до показателя 1908.5 ± 105.7 ($P < 0.001$), что свидетельствовало об уменьшении воспалительных процессов в легких; увеличивался уровень продукции активных форм кислорода нейтрофилами, отражающий их бактерицидный потенциал, который до лечения был снижен в 2.7 раза по сравнению с контрольной группой животных ($P < 0.001$). После введения наночастиц серебра было отмечено восстановление соотношения популяций лимфоцитов в селезенке и цитокинового баланса, выраженное в снижении уровней интерферона-гамма (**ИФН-γ**), фактора некроза опухоли-альфа (**ФНО-α**) и интерлейкина-4 (**ИЛ-4**) в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа у больных туберкулезом мышей. Таким образом, впервые было показано, что ингаляционное введение наночастиц серебра, стабилизированных поливинилпирролидоном, приводило не только к заметному бактерицидному эффекту, но и восстанавливало баланс иммунной системы мышей.

*Ключевые слова: Mycobacterium tuberculosis*, наночастицы серебра, лимфоциты, нейтрофилы, проточная цитофлюорометрия, цитокины, окислительный взрыв

**DOI:** 10.31857/S0555109920020087

Туберкулез (**ТБ**) является социально значимой инфекцией в мире. По данным Всемирной Организации Здравоохранения туберкулез – одна из десяти самых распространенных причин смерти в человеческой популяции. Несмотря на все проводимые мероприятия по борьбе с ТБ, уровень заболеваемости и смертности от данной инфекции остается высоким. В 2017 г. туберкулезом заболело 10 миллионов человек, а умерло около 1.3 миллиона человек [1].

Основным компонентом в лечениии туберкулеза остается антибиотикотерапия. Однако противотуберкулезная химиотерапия имеет серьезные недостатки. Увеличивается резистентность *Mycobacterium tuberculosis* к используемым антибиотикам, проявляется их побочное действие из-за длительности приема, больших доз и необходимости применять в комбинации сразу нескольких антибиотиков. Рекомендованные схемы лечения имеют низкую эффективность, высокую стоимость и требуют длительного лечения [2].

Растущая заболеваемость ТБ и устойчивость микобактерий к антибиотикам побуждает ученых искать другие эффективные противотуберкулезные агенты. Сегодня в этой области разрабатываются несколько направлений, включающих использование моноклональных антител [3, 4], микобактериофагов [5, 6], бактериальных вакцин [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634041/], иммуномодуляторов [7] и наночастиц серебра (**НЧС**) [8, 9]. С древних времен серебро являлось одним из основных антимикробных средств в медицине и использовалось в лечении инфекционных заболеваний. Терапевтические свойства серебра известны более 2000 лет [10]. В настоящее время развитие нанотехнологий позволило изменять размеры и свойства веществ на наноуровне, результатом чего стало увеличе-

ние антимикробного потенциала серебра путем использования его в форме наночастиц. Применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением бактерицидных свойств [11] и использовать данные препараты в медицине (перевязочные материалы, покрытия медицинских приборов, антимикробные препараты) [https://link.springer.com/article/10.1186/2228-5326-2-32, 12]. Наночастицы серебра характеризуются бактерицидностью против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3199605/,13], включая антибиотикорезистентные штаммы [14]. В ряде научных работ показана антибактериальная активность НЧС в отношении микобактерий, в том числе лекарственно-устойчивым клиническим изолятам, а также отмечается значительное увеличение эффективности применения противотуберкулезных антибиотиков в комбинации с наночастицами серебра [8, 9, 15]. Изучение взаимосвязи проводимого лечения с иммунным статусом больных туберкулезом является одним из наиболее важных и активно развивающихся направлений во фтизиатрии [16]. Ранее было показано, что наночастицы активны против *M. tuberculosis* со множественной устойчивостью к антибиотикам (https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02207/full), а ингаляционное введение наночастиц повышает эффективность антибиотиков [17]. Однако, вопрос одновременной оценки бактерицидной и иммуномодулирующей активности наночастиц, остается открытым. Недавно были опубликованы данные об одновременной оценки бактерицидной и иммуномодулирующей активности наномодифицированных поверхностей [18]. Но эта работа проводилась на других микроорганизмах и без применения животных моделей.

Цель работы – изучение антимикробной активности наночастиц серебра в отношении возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis* и оценка иммунных показателей экспериментальных животных после воздействия данных наночастиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Наночастицы серебра.** В работе использовали водную дисперсию наночастиц серебра, стабилизированных низкомолекулярным полимером медицинского назначения поливинилпирролидоном (НЧС-ПВП) (препарат “Арговит”, ООО НПЦ “Вектор-Вита”, Россия). В предыдущих исследованиях нанодисперсного компонента данного препарата было показано, что в нем содержится 1.0–1.4% серебра (по массе) и 18.6–19.0% ПВП с молекулярной массой 15–30 кДа, а средний диаметр наночастиц серебра составляет 43.6 ± 10.7 нм [19, 20].

**Штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**. Приготовление стоков *Mycobacterium tuberculosis* осуществляли из лиофильно высушенной культуры, полученной из отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ (“ГКПМ – Оболенск” ФБУН ГНЦ ПМБ). Бактерии культивировали во флаконах объемом 100–500 мл в модифицированной жидкой среде Middelbrook 7H9 (“Himedia”, Индия) с добавкой 10% OADC и 0.05% Твина 80 в течение 21 сут при температуре 37°C в микроаэрофильных условиях. Культуры выращивали до оптической плотности, соответствующей $5 \times 10^7$–$10^8$ КОЕ.

**Определение антимикробной активности наночастиц серебра.** Определение антимикробной активности наночастиц серебра *in vitro* проводили суспензионным методом (МУ 3.5.2596-10). Для этого готовили рабочую суспензию штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в концентрации $1 \times 10^9$ КОЕ/мл, что обеспечивало возможность создания в смеси (наночастицы серебра с суспензией) концентрацию микроорганизмов порядка $1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Смешивали суспензию микобактерий и наночастиц серебра в соотношении 1 : 9. Проверяли концентрации 0.1, 1.0, 10, 25 и 50 мкг/мл. Концентрация 50 мкг/мл была максимальной для данного препарата, поэтому ингибирующее действие оценивали не по значению минимальной ингибирующей концентрации (**МИК**), а по подавлению роста (КОЕ) микобактерий. Экспозиция наночастиц серебра с микобактериями составила 1 ч при 37°C. Данной экспозиции достаточно для необратимого взаимодействия наночастиц серебра с мембранными структурами бактерий. В контрольные пробирки вместо наночастиц добавляли забуференный физиологический раствор. После экспозиции из смеси проиводили посев из каждой пробы по 0.1 мл на чашки Петри с плотной питательной средой Middlebrook 7H11 AgarBase (“HiMedia”, Индия) с добавлением 10% сыворотки КРС и культивировали в термостате при 37°C 21 сут. Затем проводили подсчет КОЕ.

**Экспериментальные животные.** В работе использовали мышей линии C57Bl/6: самки в возрасте 7–8 нед., весом 18–20 г. Животные были получены из филиала “Андреевка” “Научный центр биомедицинских технологий” Российской академии медицинских наук (пос. Андреевка, Россия). Мышей содержали группами по 5 животных в микроизоляторах. В свободном доступе мыши получали стандартный гранулированный корм и питьевую воду.

**Схема эксперимента**. Животные были разделены на три группы (две опытные и контрольная) по 15 мышей в каждой. Животные опытных групп были заражены штаммом *M. tuberculosis* H37Rv внутрибрюшинно введением 0.2 мл суспензии микобактерий в забуференном физиологическом растворе в дозе $5 \times 10^4$ КОЕ/животное (мышиная модель экспериментального хронического туберкулеза). Через 4 мес. мышей из одной опытной группы (ТБ+НЧС-ПВП) ингаляционно обрабо-

тали НЧС-ПВП в аэрозольной камере CO 099C A4224 (“GLAS-COL Apparatus”, США). При ингаляционном введении аэрозоль генерировался из водной дисперсии наночастиц серебра калиброванным стеклянным распылителем, представляющим конструктивно трубку Вентури с объемом распыляемой жидкости до 7 см$^3$. Введение препарата проводили однократно в дозе 0.1 мг наночастиц серебра на 1 кг массы тела. Мышей из второй опытной группы (ТБ) через 4 мес. после заражения ингаляционно однократно обработали физиологическим раствором аналогичным способом. Контрольная группа животных (контроль) – здоровые мыши, однократно ингаляционно обработанные физиологическим раствором аналогичным способом. Микробиологические высевы из легких и селезенок опытных групп животных проводили на 1, 10 и 30 сут после обработки наночастицами серебра. Оценку иммунных показателей проводили у мышей всех групп животных. Изучение многократного ингаляционного воздействия наночастиц серебра на аналогичные иммунные показатели здоровых мышей в дозе 0.1 мг/кг было проведено и опубликовано ранее [20].

**Определение КОЕ *M. tuberculosis***. Определение КОЕ *M. tuberculosis* H37Rv в органах зараженных животных проводили высевом гомогенатов органов в 10-кратном разведении в забуференном физиологическом растворе на плотную питательную среду Middelbrook 7H11 AgarBase (“Himedia”, Индия) с добавлением 10%-ной сыворотки КРС. Учет колоний проводили на 28 сут.

**Получение культуры спленоцитов** [21]. Селезенки опытных и контрольных групп мышей стерильно гомогенизировали через капроновый фильтр в среду RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия). Клеточную суспензию отмывали путем центрифугирования при 250 g по 10 мин. Осадок ресуспендировали в полной питательной среде RPMI-1640. Число жизнеспособных клеток определяли в тесте с трипановым синим с помощью автоматического клеточного счетчика Countess™ (“Invitrogen”, Корея). Количество жизнеспособных спленоцитов доводили до концентрации $5 \times 10^6$ кл./мл.

**Получение нейтрофилов перитонеального экссудата** [21]. Для рекрутизации нейтрофилов в брюшную полость мышам вводили внутрибрюшинно 2 мл мясо-пептонного бульона и через 2 ч эвтаназировали мышей. После декапитации и обескровливания животного асептически готовили рабочую область. Затем делали небольшое отверстие в брюшной стенке и пятикратно промывали брюшную полость холодным (4°C) раствором Хенкса. Полученную из брюшной полости клеточную суспензию помещали на ледяную баню и использовали для экспериментов не позже, чем через 1 ч после получения. Число жизнеспособных клеток определяли в тесте с трипановым синим с помощью автоматического клеточного счетчика Countess™ (“Invitrogen”, Корея). Количество жизнеспособных нейтрофилов доводили до концентрации $5 \times 10^6$ кл./мл.

**Определение субпопуляционного состава лимфоцитов и количества цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов селезенки**. Определение проводили методами проточной цитофлюорометрии как описано [21, 22]. Спленоциты ($5 \times 10^6$ кл./мл) опытных и контрольных групп мышей окрашивали моноклональными антителами CD3 PerCP, CD4 APC, CD8 PE, CD19 APC, IFN-γ FITC и TNF-α APC (“eBioscience”, США) в течение 20 мин в темноте при 20°C в соответствии с инструкцией производителя. Полученные образцы отмывали в фосфатно-солевом буфере и фиксировали 1%-ным раствором формалина. Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США). Процентное содержание субпопуляций клеток в образцах определяли с использованием программы “CellQuest Pro”.

**Определение количества ИФН-γ и ФНО-а в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа.** Определение проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов “Mouse IFN-γ ELISA” и “TNF-α ELISA” (“Bender MedSystems”, Австрия) в соответствии с руководством производителя. Оптическую плотность измеряли на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при длине волны 450 нм.

**Определение продукции активных форм кислорода нейтрофилами методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ).** В каждую лунку 96-луночного планшета вносили суспензию нейтрофилов ($5 \times 10^6$ кл./мл), для усиления ХЛ применялся раствор люминола с концентрацией $5.6 \times 10^{-4}$ М (“BioChemika”, Чехия). В качестве индуктора фагоцитоза был использован опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл (“Sigma”, США). Значение ХЛ измерялось 6 раз на универсальном планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при 37°C. Длительность одного измерения составляла 10 мин. Интенсивность хемилюминесценции выражали количеством импульсов, накопленных за одно измерение.

**Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхо-легочного лаважа.** Определение проводили с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Sigma”, США). Оптическую плотность измеряли на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при длине волны 562 нм.

**Статистическая обработка результатов**. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия между группами признавали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

**Таблица 1.** Содержание субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей (%)

| Показатель | Содержание лимфоцитов в селезенке мышей линии C57Bl/6, % | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Т-лимфоциты | Т-хелперы | цитотоксические лимфоциты | В-лимфоциты |
| ТБ | 41.89 ± 2.25* | 28.47 ± 1.37* | 4.13 ± 0.18 | 27.14 ± 1.38* |
| ТБ + НЧС-ПВП | 37.23 ± 1.85 | 24.31 ± 1.23 | 5.54 ± 0.27 | 34.02 ± 1.72 |
| Контроль | 36.12 ± 1.72 | 23.02 ± 1.15 | 6.32 ± 0.31 | 35.41 ± 1.82 |

* Статистически значимое различие по сравнению с контролем при $P < 0.05$. Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через 1 мес. после введения НЧС-ПВП.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения антимикробной активности наночастиц серебра разной концентрации *in vitro* представлены в табл. 1. Подавление роста микобактерий штамма *M. tuberculosis* H37Rv на плотной питательной среде Middelbrook 7H11 AgarBase (“Himedia”, Индия) с добавлением 10% сыворотки КРС наблюдалось после экспозиции в суспензии с НЧС-ПВП в концентрациях 10, 25 и 50 мкг/мл. Количество выросших КОЕ микобактерий снижалось в 2 раза после воздействия НЧС-ПВП в концентрации 50 мкг/мл (табл. 1).

В экспериментах, проведенных на мышах с хронической формой туберкулеза, до введения НЧС-ПВП среднее количество микобактерий в легких было $4.2 \times 10^2$ КОЕ, а в селезенке – $4.4 \times 10^2$ КОЕ. Через 10 сут после ингаляционного введения НЧС-ПВП животным наблюдалось резкое снижение обсемененности органов (среднее количество микобактерий в легких составило 10 КОЕ, а в селезенке – 21 КОЕ), которое сохранялось до 30 сут (рис. 1).

Полученные нами данные об антимикробной активности НЧС-ПВП в отношении *M. tuberculosis* H37Rv согласуются с работами других исследователей. Так, Selim et al.по-русски или в работе [9] показали, что минимальная подавляющая концентрация наночастиц серебра (50 нм) для штамма *M. tuberculosis* H37Rv составила 1 мкг/мл [9]. Захаров с соавт., изучили совместное воздействие наночастиц серебра (3–60 нм) с изониазидом в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Было установлено, что в сочетании с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл минимальная подавляющая концентрация наночастиц серебра для микобактерий составляла 2.5 мкг/мл. В экспериментах *in vivo* авторы определяли влияние НЧС на продолжительность жизни мышей, больных ТБ. Так, индекс выживаемости животных при использовании только НЧС в дозах 12.5 и 50 мкг/кг был равен индексу выживаемости животных, получавших изониазид в дозе 50 мг/кг, и составлял 40%. А при лечении НЧС в дозе 25 мкг/кг индекс выживаемости увеличивался до 60%. При совместном использовании НЧС с изониазидом (50 мг/кг) индекс выживаемости мышей составлял от 80 до 100% [15].

Течение и исход туберкулезной инфекции во многом определяется степенью активации Th1-лимфоцитов и фагоцитов [23]. Ключевая роль в формировании клеточного иммунного ответа при туберкулезной инфекции отводится различным субпопуляциям Т-лимфоцитов: CD4+–Т-лимфоцитам-хелперам, регулирующим фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов и CD8+ цитотоксическим-Т-лимфоцитам, способным оказывать прямое цитотоксическое действие на клетки, инфицированные микобактериями [24]. В группе больных ТБ мышей было выявлено увеличение относительного количества Т-лимфоцитов за счет субпопуляции Т-хелперов и снижение относительного количества цитотоксических-Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в селезенке. В группе больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП относительное количество Т-лимфоцитов (в том числе Т-хелперов и цитотоксических-Т-лимфоцитов) и В-лимфоцитов в селезенке не отличалось от значений данных показателей в контрольной группе животных (табл. 2).

При микобактериальных инфекциях происходит преимущественное образование Т-лимфоци-

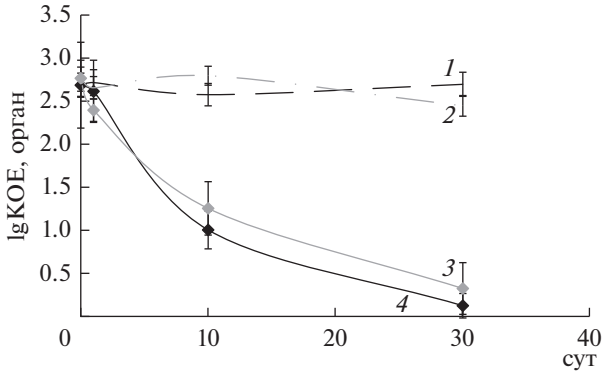


**Рис. 1.** Динамика снижения обсемененности органов *M. tuberculosis* у мышей, больных хроническим ТБ, в течение месяца после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП: *1* – обсемененность легких микобактериями в группе больных ТБ мышей; *2* – обсемененность селезенок микобактериями в группе больных ТБ мышей; *3* – обсемененность селезенок микобактериями в группе больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП; *4* – обсемененность легких микобактериями в группе больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП.

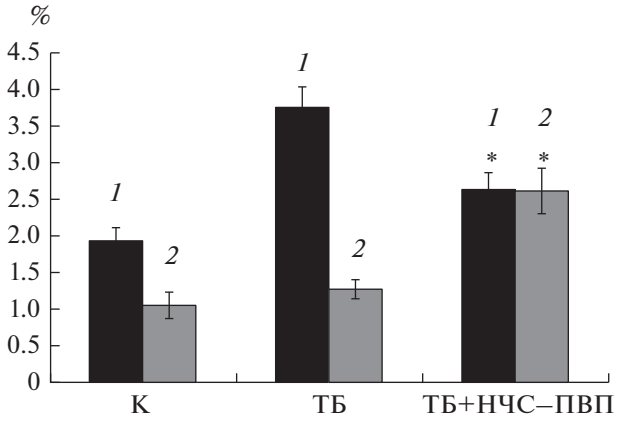


**Рис. 2.** Количество (%) продуцирующих цитокин Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$): *1* – $CD3^+CD4^+$ИФН-$\gamma^+$; *2* – $CD3^+CD4^+$ФНО-$\alpha^+$. К (контроль)– группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0.05$).

тов 1 типа, характерными чертами которых является продукция цитокинов ИФН-γ и ФНО-α [23]. Оба цитокина способны стимулировать антимикобактериальную активность макрофагов, чем в первую очередь, и обусловлен протективный эффект Т-хелперов. В проведенных экспериментах показано, что в группе мышей больных ТБ процентное содержание продуцирующих ИФН-γ Т-хелперов возрастало в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 2). Ингаляционное введение НЧС-ПВП больным ТБ мышам приводило к снижению относительного количества ИФН-гамма-продуцирующих лимфоцитов в селезенке. Можно предположить, что уменьшение относительного количества продуцирующих ИФН-γ лимфоцитов в селезенке больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП вызвано уменьшением количества клеток *M. tuberculosis.* По мнению ряда авторов, высокое содержание продуцирующих ИФН-γ-лимфоцитов у больных туберкулезом является следствием перманентной стимуляции Т-клеток антигенами микобактерий и увеличением пула антигенспецифических Т-лимфоцитов. Лечение туберкулеза сопровождается снижением количества ИФН-γ-позитивных клеток [25].

Изучение динамики изменения содержания свободного ИФН-γ в сыворотке крови больных ТБ мышей в течение месяца после введения НЧС-ПВП показало достоверное увеличение количества данного цитокина на 7 сут после воздействия. Содержание ИФН-γ в группе больных ТБ мышей составляло 26.6 ± 1.83 пг/мл, а на 7 сут после введения НЧС-ПВП – 41.34 ± 3.06, $P < 0.05$. На 30 сут уровень ИФН-γ снижался до 30.20 ± ± 1.62 пг/мл, но оставался достоверно выше показателей контрольной группы и группы мышей, больных ТБ (рис. 3а). В жидкости БЛЛ больных ТБ мышей на 7 сут после введения НЧС-ПВП также наблюдалось значительное увеличение содержания ИФН-γ до значения 85.00 ± 5.68 пг/мл по сравнению с уровнем данного цитокина до введения НЧС-ПВП (50.01 ± 3.33 пг/мл, $P < 0.05$). НА 30 сут после введения НЧС-ПВП содержание ИФН-γ составляло 39.00 ± 2.35 пг/мл, что достоверно ниже содержания данного цитокина в группе больных ТБ мышей ($P < 0.05$)(рис. 3б). Значительное увеличение содержания данного

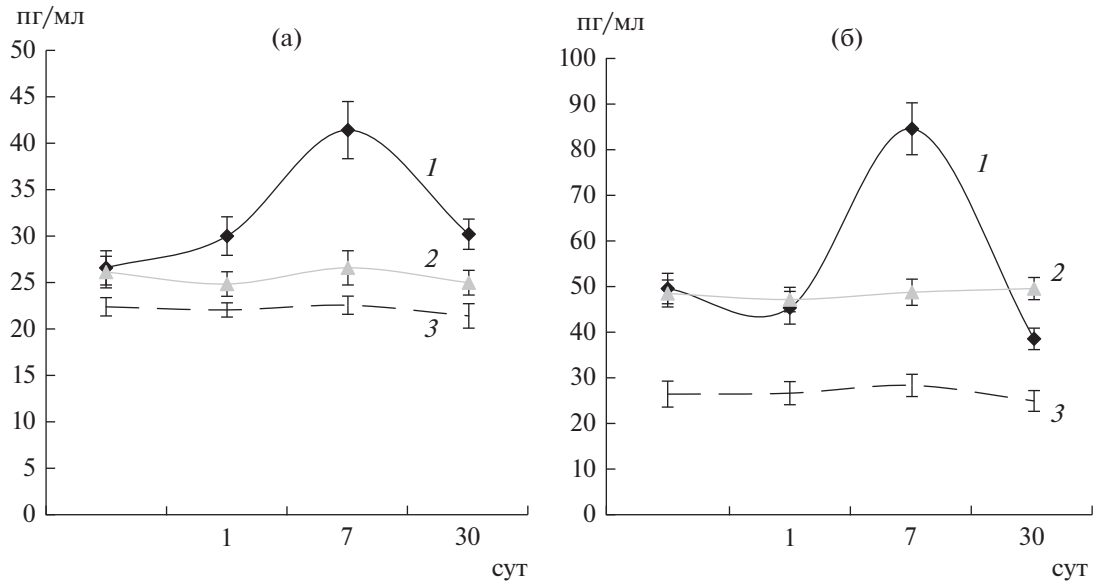


**Рис. 3.** Динамика изменения содержания ИФН-γ в сыворотке крови мышей (а) и в жидкости бронхо-легочного лаважа (б) в течение месяца. *1* – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП, *2* – группа больных ТБ мышей, *3*– группа здоровых мышей.

цитокина в сыворотке и жидкости БЛЛ через 7 сут после введения НЧС-ПВП больным ТБ мышам по времени совпадало с уменьшением количества микобактерий в легких и селезенке. В работе [25]отмечается, что у больных туберкулезом уровень ИФН-γ в крови снижен по сравнению со здоровыми лицами, а лечение туберкулеза сопровождалось повышением сывороточного уровня ИФН-γ.

Несмотря на то, что ингаляционное введение НЧС-ПВП больным ТБ мышам приводило к увеличению относительного количества ФНО-α-продуцирующих Т-хелперов в селезенке (рис. 2), количество свободного ФНО-а в сыворотке крови и жидкости БЛЛ – уменьшалось (рис. 4, 5), что указывало на снижение уровня воспалительных реакций организма [23, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761866].

Для лучшего понимания воздействия НЧС-ПВП на течение хронического туберкулеза мы определили содержание противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 (ИЛ-4) в сыворотке крови и жидкости БЛЛ экспериментальных животных. В результате проведенных исследований в группе больных ТБ мышей было установлено значительное увеличение содержания свободного ИЛ-4 в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ в 6 и 17 раз соответственно относительно значений данных показателей в контрольной группе (3.67 ± 0.72 и 4.12 ± 0.64 пг/мл, $P < 0.001$). Через 30 сут после введения наночастиц серебра у мышей, больных ТБ, наблюдалось снижение уровня ИЛ-4 до 4.23 ± ± 1.08 пг/мл в сыворотке крови и до 3.91 ± ± 0.55 пг/мл в жидкости БЛЛ ($P < 0.001$), что достоверно не отличалось от содержания ИЛ-4 в исследованных биологических жидкостях животных контрольной группы (рис. 4, 5). Фтизиатры отмечают, что при тяжелых формах туберкулезной инфекции, а также на ее поздних стадиях наблюдается локальное и системное повышение продукции ИЛ-4 [26]. Однако иммунный ответ с избыточной продукцией ИЛ-4 скорее является иммунопатологическим, чем защитным и не может уничтожить микобактериальную инфекцию (бактериостатический иммунный ответ) [27], поэтому снижение содержания ИЛ-4 является благоприятным прогностическим маркером после противотуберкулезной химиоиммунотерапии [28].

Нейтрофилы являются одними из первых клеток, которые мигрируют в очаг туберкулезной инфекции, где постепенно накапливаются с развитием хронической стадии заболевания [23, 29]. Нейтрофилы человека и мыши эффективно фагоцитируют микобактерии, участвуют в инициации Т-клеточного ответа [30, 31] и в образовании гранулемы [32]. Одним из механизмов бактерицидного действия нейтрофилов является продукция активных форм кислорода (окислительный взрыв) [33], уровень которой может быть измерен с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции. В нашей экспериментальной работе в группе больных ТБ мышей наблюдалось достоверное снижение уровня продукции активных форм кислорода (**АФК**) нейтрофилами в 2.7 раза по сравнению с контрольной группой животных ($P < 0.001$).

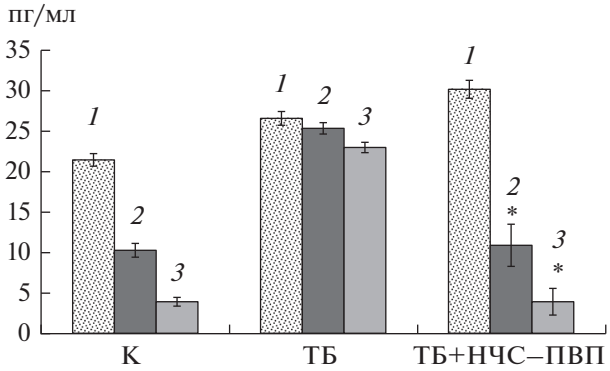


**Рис. 4.** Содержание цитокинов в сыворотке крови мышей: *1* – ИФН-γ, *2* – ФНО-α, *3* – ИЛ-4. К (контроль) – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через 1 мес. после введения НЧС-ПВП. *Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0.001$).

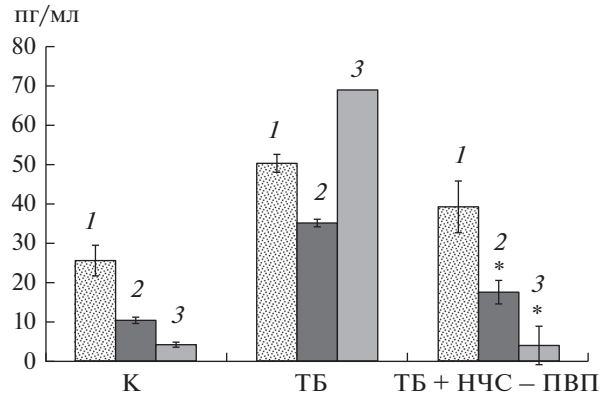


**Рис. 5.** Содержание цитокинов в жидкости бронхолегочного лаважа мышей: *1*– ИФН-γ, *2* – ФНО-α, *3* – ИЛ-4. К (контроль) – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через 1 мес. после введения НЧС-ПВП. * Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0.001$).

В группе больных мышей, обработанных НЧС-ПВП, через 1 и 7 сут после введения наночастиц также отмечалось снижение продукции АФК относительно контроля, однако через 30 сут было установлено достоверное увеличение данного показателя в 2.5 раза ($P < 0.001$) относительно группы больных ТБ мышей, необработанных наночастицами серебра (рис. 6). Наблюдаемое в нашей работе снижение продукции АФК нейтрофилами у больных ТБ мышей согласуется с данными работы [34] или по русски фамилию, где отмечается, что у мышей, зараженных микобактериями, нарушается окислительный взрыв нейтрофилов. Уста-

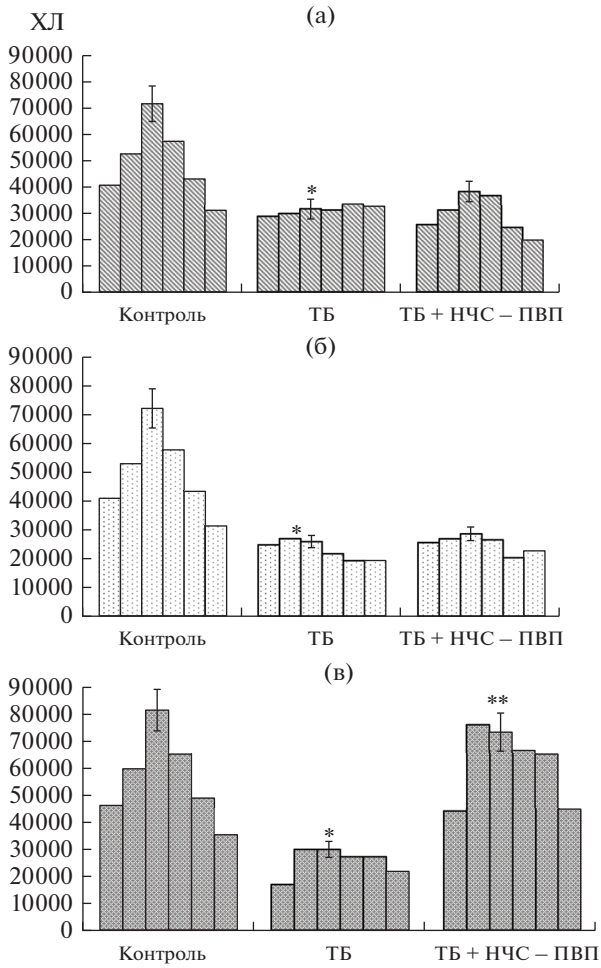


**Рис. 6.** Уровень продукции АФК нейтрофилами мышей в контроле и эксперименте после введения НЧС через 1 (а), 7 (б) и 30 (в) сут. Контроль (К)– группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП. Значение ХЛ измерялось в течение 1 ч 6 раз, длительность одного измерения 10 мин. Каждый столбец – одно измерение. * Результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P < 0.001$). ** Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0.001$).

новленное нами увеличение продукции АФК нейтрофилами через 30 сут после введения НЧС-ПВП опосредовано, скорее всего, снижением микобактериальной нагрузки организма.

Воспаление всегда сопровождает инфекцию и представляет собой важнейший компонент иммунной защиты хозяина. Однако гипервоспалительные реакции могут способствовать обострению заболевания [23]. Повышение концентрации белка в жидкости бронхо-легочного лаважа является одним из признаков легочного воспаления, так как отражает альвеолярно-капиллярную проницаемость [35]. Данный показатель был выбран нами для оценки уровня воспаления в легких экспериментальных животных. У мышей, больных ТБ, наблюдалось увеличение содержания белка в жидкости БЛЛ в 4 раза по сравнению с таковым показателем в контрольной группе животных (табл. 3). После воздействия НЧС-ПВП количество белка в жидкости БЛЛ снижалось в 2 раза до показателя 1908.5 ± 105.7 ($P < 0.001$), что отражает уменьшение воспаления в легких (табл. 3).

На основании проведенной работы можно заключить, что наночастицы серебра обладают антимикробной активностью в отношении штамма *M. tuberculosis* H37Rv в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В проведенной нами работе отмечено восстановление иммунных показателей больных ТБ мышей после воздействия НЧС. В предыдущей работе [20] было показано, что многократное ингаляционное введение НЧС-ПВП здоровым мышам в той же дозе не вызывало иммунопатологических изменений у экспериментальных животных, поэтому НЧС могут рассматриваться в качестве перспективных препаратов в мероприятиях профилактики и лечения туберкулеза.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с “Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных” (Institute of Laboratory Animals Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. – National Academy Press: Washington. 1996. 138 с.)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. *Caminero J.A., Scardigli A.* // Eur. Respir. J. 2015. V. 46. P. 887–893.
3. *Balu S., Reljic R., Lewis M.J., Pleass R.J., McIntosh R., Kooten C. et al.* // The J. Immunol. 2011. V. 186. № 5. P. 3113–3119.
4. *Abate G., Hoft D.F.* // ImmunoTargets and Therap. 2016. V. 5. P. 37–45.
5. *Gondil V.S., Chhibber S.* // Biomed. Biotechnol. Res. J. 2018. V. 2. № 1. P. 9–15.
6. *Kiefer B., Dahl J.L.* // Adv. Microbiol. 2015. V. 5. P. 699–710.
7. *Abate G., Hoft D.F.* // ImmunoTargets and Therapy. 2016. V. 5. P. 37–45
8. *Banu A., Rathod V.* // J. Nanomed. Biotherapeut. Discov. 2013. V. 3. № 1. https://doi.org/10.4172/2155-983X.1000110
9. *Selim A., Elhaig M.M., Taha S.A., Nasr E.A.* // Rev. Sci. Tech. 2018. V. 37. № 3. P. 823–830.
10. *Alexander, J.W.* // Surg. Infect. (Larchmt). 2009. V. 10. № 3. P. 289–292.
11. *Фастовец И.А., Верховцева Н.В., Пашкевич Е.Б., Нетрусов А.И.* // Проблемы агрохимии и экологии. 2017. № 1. С. 51–62.
12. *Schierholz J.M., Lucas L.J., Rump A., Pulverer G.* // J. Hospital Infection. 1998. № 40. P. 257–262.
13. *Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G. et al.* // Molecules. 2015. V. 20. P. 8856–8874.

14. *Lara H.H., Ayala-Nuñez N.V., Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 615–621
15. *Захаров А.В., Эргешов А.Э., Хохлов А.Л., Кибрик Б.С.* Эффективность сочетания изониазида и наночастиц серебра в лечении экспериментального туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95. № 6. С. 51–58.
16. *Аршинова С.С., Симонова А.В., Стаханов В.А., Пинегин Б.В.* // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3. № 4. С. 567–573.
17. *Ellis T., Chiappi M., García-Trenco A., Al-Ejji M., Sarkar S. et al.* // CS Nano. 2018. V. 126. P. 5228–5240.
18. *Ponomarev V.A., Sheveyko A.N., Permyakova E.S., Lee J., Voevodin A.A. et al.* ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. № 32. P. 28699–28719.
19. *Шумакова А.А., Смирнова В.В., Тананова О.Н., Трушина Э.Н., Кравченко Л.В., Аксенов И.В. и др.* // Вопросы питания. 2011. Т. 80. № 6. С. 9–18.
20. *Калмантаева О.В., Фирстова В.В., Потапов В.Д., Зырина Е.В., Герасимов В.Н., Ганина Е.А. и др.* // Российские нанотехнологии. 2014. Т. 9. № 9–10. С. 78–82.
21. *Coligan J.E., Bierer E.B., Margulies H.D., Shevach E.M., Stroder W.* Short rotocols in Immunology: a Compendium of Methods from Current Protocols in Immunology / Ed. J.E. Coligan. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc, 2005.
22. *Kaufmann S.H.E., Kabelitz D.* Methods in Microbiology. Immunology of infection. 2 Ed. / Ed. S.H.E. Kaufmann, D. Kabelitz. London: Acad. Press, 2002. V. 32. 806 p.
23. *Cardona P.J.* Understanding Tuberculosis – Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity / Ed. P.J. Cardona. Croatia: InTech, 2012. 560 p.
24. *Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Михеева К.О., Игнатов М.В. и др.* // Бюллетень сибирской медицины. 2012. № 1. С. 39–45.
25. *Лядова И.В., Гергерт В.Я.* // Туберкулез и болезни легких. 2009. № 11. С. 9–18.
26. *Перельман М.И.* Национальное руководство. Фтизиатрия / Ред. М.И. Перельмана. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 512 с.
27. Report of the Expert Consultation on Immunotherapeutic Interventions for Tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2007. @страницы
28. *Лысов А.В, Никонов С.Д., Редькин Ю.В., Анфилофьева О.Ю., Казаков А.В., Буркова И.В.* // Terra Medica Nova. 2009. № 4–5. С. 13–16.
29. *Appelberg R.* // Clin. Exp. Immunol. 1992. V. 89. P. 120–125.
30. *Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P., Tanguy M. et al.* // Blood. 2005. V. 106. № 5. P. 1843–1850.
31. *Blomgran R., Ernst J.* // J. Immunol. 2011. V. 186. № 12. P. 7110–7119.
32. *Seiler P., Aichele P., Bandermann S., Hauser A., Lu B., Gerard N. et al.* // Eur. J. Immunol. 2003. V. 33. № 10. P. 2676–2686.
33. *Elsbach P., Weiss J.* // Immunol. Lett. 1985. V. 11. P. 159–163.
34. *Seiler P., Aichele P., Raupach B., Odermatt B., Steinhoff U., Kaufmann S.* // J. Infec. Dis. 2000. V. 181. P. 671–680.
35. *Muller J., Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J.F., Delos M. et al.* // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005. V. 207. № 3. P. 221–231.

# Antibacterial and Immunomodulating Activity of Silver Nanoparticles on Mice Experimental Tuberculosis Model

**O. V. Kalmantaeva[a], *, V. V. Firstova[a], N. S. Grishchenko[a], T. I. Rudnitskaya[a], V. D. Potapov[a], S. G. Ignatov[a]**

[a]*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, 142279 Russia*
**e-mail: kalmantaevaov@yandex.ru*

Received September 16, 2019; revised October 10, 2019; accepted November 1, 2019

In this study we have identified antibacterial activity of silver nanoparticles 43.6 ± 10.7 nm against strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* (the studied concentrations of silver nanoparticles were 0.1; 1; 10; 25 и 50 μg/mL) and in an experimental murine model of chronic tuberculosis. We have shown that silver nanoparticles at a concentration of 50 μg/ml suppress the growth of mycobacteria *in vitro* by 2 times. Inhalation administration of silver nanoparticles at a dose of 0.1 mg/kg to tuberculosis-infected mice resulted in a two-fold decrease in the colonization of the lungs and spleens of *M. tuberculosis*. In these animals, the quantity of protein in the broncho-pulmonary lavage fluid was reduced two-fold to 1908.5 ± 105.7 ($P < 0.001$), which indicates a decrease in the inflammatory processes in the lungs; the level of production of reactive oxygen species by neutrophils increased, reflecting their bactericidal potential, which was reduced by 2.7 times before treatment compared to the control group of animals ($P < 0.001$). After the introduction of silver nanoparticles, a recovery in the ratio of lymphocyte populations in the spleen and cytokine balance was observed, expressed in a decrease in the levels of IFN-γ, TNF- α and IL-4 in blood serum and broncho-pulmonary lavage fluid in TB mice. Thus, for the first time it was shown that inhalation of silver nanoparticles stabilized with polyvinylpyrrolidone led not only to a noticeable bactericidal effect, but also recovered the balance of the immune system of mice.

*Keywords: Mycobacterium tuberculosis*, silver nanoparticles, lymphocytes, neutrophils, flow cytometry, cytokines, oxidative burst

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 198–205

УДК 579.6

# ИММОБИЛИЗАЦИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЛАЗМЕННОЙ ОБРАБОТКОЙ

**© 2020 г. О. И. Гулий[1, 2, *], В. В. Симаков[3], О. А. Караваева[1], А. В. Смирнов[4]**

[1]*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049 Россия*

[2]*Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия*

[3]*Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410005 Россия*

[4]*Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва, 125009 Россия*

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

Поступила в редакцию 05.09.2019 г.
После доработки 15.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Показана возможность иммобилизации микробных клеток на полимерных матрицах, модифицированных плазменным травлением. На примере микробных клеток *Azospirillum brasilense* Sp7, *A. lipoferum* Sp59b и *Escherichia coli* XL-1 установлено, что эффективность иммобилизации биологических объектов зависит от времени обработки полимерных пленок в плазме. Обработка пленки полистирола в плазме высокочастотного разряда позволяла существенно увеличить время жизни клеток, иммобилизованных на ее поверхности. Показано, что оптимальное время обработки пленок в плазме составляло 30 с, время для иммобилизации микробных клеток ~ 20 мин, после иммобилизации бактерии сохраняли жизнеспособность до 6 мес. Предложено использование полимерных матриц, модифицированных плазменным травлением, в качестве носителя для иммобилизации клеток при создании биосенсоров.

*Ключевые слова:* иммобилизация, микробные клетки, пленки полистирола, плазменное травление, капиллярная конденсация

**DOI:** 10.31857/S0555109920020075

Развитие методов иммобилизации бактерий и поиск оптимального носителя открывает новые возможности при создании биосенсоров. Иммобилизованные клетки называются “иммобилизованные биокатализаторы” (в соответствии с номенклатурой Европейской федерации по биотехнологии) [1]. Основные подходы к иммобилизации клеток состоят из их включения внутрь носителя или их фиксации на его поверхности. Адсорбционные методы иммобилизации относятся к числу наиболее простых и “естественных”, которые, как правило, слабо влияют на ферментативную систему клеток [2]. Адсорбентом могут быть различные вещества, такие как активированный уголь, глина, волокна ацетата целлюлозы и др. Наиболее широко для иммобилизации используются следующие электропроводящие полимеры: полианилин, полипиррол, политиофен и др. [3]. К значительным преимуществам полимерных покрытий относятся как удобство их формирования на поверхностях любой формы и размеров, так и переход к композиционным покрытиям путем введения в объем полимера наноразмерных включений. Полимерные пленки, в том числе и пленки полистирола (**ПС**), находят широкое применение в различных областях медицины, нано- и биотехнологии, а также сенсорных технологиях [4, 5]. К преимуществам пленок ПС можно отнести относительно небольшую удельную плотность, необходимый уровень прочности, высокие влагостойкость и сопротивляемость к низким температурам, инертность к агрессивному воздействию кислот и щелочей, а также отличные электроизоляционные и диэлектрические качества. Однако недостаточная адсорбционная способность пленок ПС вносит некоторые ограничения в области их применения [6]. От таких параметров как шероховатость, смачиваемость, морфология поверхности, наличие на поверхности функциональных групп, зависят показатели бактериальной и клеточной адгезии и последующей пролиферации и др. Одним из эффективных способов управления адсорбционной способностью является обработка поверхности пленки в плазме. Плазменная технология стала стандартным элементом инженерии поверхностей, приводящей к снижению или повышению

поверхностного натяжения, обезжириванию металлических частей и полимеризации пленок с заданными свойствами. При этом поверхностная плазменная модификация является уникальным инструментом, который позволяет избирательно улучшать поверхностные свойства материала, не затрагивая его объемных свойств, обеспечивать биосовместимость пленок и увеличивать их адсорбционные свойства [7–11].

Значительный интерес представляет оценка возможности применения пленок ПС, модифицированных плазменным травлением, для иммобилизации микробных клеток и создания биокатализаторов для сенсорных систем.

Цель работы – исследование возможности иммобилизации бактериальных клеток на поверхности пленок ПС, модифицированных плазменной обработкой, и оценка времени сохранения жизнеспособности бактерий.

## МЕТОДИКА

**Микробные клетки и условия их культивирования**. В работе использовали микробные клетки *Azospirillum brasilense* Sp7 (IBPPM 150), *Escherichia coli* XL-1 (IBPPM 632) and *A. lipoferum* Sp59b (IBPPM 173), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия), (http://collection.ibppm.ru).

Для получения бульонных культур микроорганизмов использовали жидкую питательную среду LB следующего состава (г/л): NaCl – 5; дрожжевой экстракт – 10 и пептон – 5. Культивирование проводили при интенсивном перемешивании на шейкере (160 об./мин) в течение 18 ч при 30 ± 1°C. После достижения логарифмической фазы роста клетки промывали дистиллированной водой (электропроводность 2 мкСм/см), отделяли центрифугированием при 3354 g в течение 5 мин и затем использовали для иммобилизации.

**Формирование и модификация пленок полистирола.** Пленки ПС получали методом центрифугирования. В качестве подложек использовали пластины монокристаллического кремния размером 10 × 10 мм$^2$. Гранулированный ПС растворяли в четыреххлористом углероде ($CCl_4$, 96 мас. %). Затем полученную смесь методом центрифугирования наносили на подложки в герметичной камере в атмосфере насыщенных паров растворителя. Скорость вращения подложки составляла 2000 об./мин. Толщина полученных пленок оценивалась по сколу образцов методом сканирующей электронной микроскопии (**СЭМ**) и составляла 280 ± 20 нм. Модификацию поверхности пленок ПС осуществляли в вакуумной камере установки Orion-40T ("VTC", Южная Корея). Подложки с нанесенной пленкой ПС располагали в зоне эрозии мишени магнетрона. Высокочастотный разряд (13.56 МГц) зажигался в атмосфере аргона. Мощность разряда составляла 100 Вт, рабочее давление в камере поддерживалось на уровне $10^{-3}$ мбар. Обработка пленок ПС осуществлялась в течение 10, 20 и 30 с. Подробные результаты изучения влияния времени плазменной обработки на морфологию и структуру поверхности пленок ПС приведены в работе [11]. Морфология образцов полимерных покрытий изучалась при помощи СЭМ Mira II ("Tescan", Чехия).

**Определение концентрации микробных клеток.** Концентрацию микробных клеток определяли по величине оптической плотности при 540 нм ($D_{540}$) в кювете с толщиной оптического слоя 1.0 см на спектрофотометре "Specol-221" ("Carl Zeiss, Jena", Германия), массу сухих клеток (г/л) рассчитывали на основании предварительно построенных калибровочных кривых.

**Иммобилизация микробных клеток**. Перед иммобилизацией проверяли оптическую плотность суспензии клеток. Для адсорбции ПС помещали в среду с клетками так, чтобы она полностью была покрыта суспензией, и инкубировали при интенсивной аэрации в течение ~20 мин при температуре 35°C. Процент адсорбированных микробных клеток определяли по разнице их содержания в суспензии до и после инкубации с носителем (% иммобилизации клеток на носителе). Данный вариант расчета не исключал ошибки при определении абсолютных величин сорбции, но воспроизводимость результатов свидетельствовала об их достоверности.

**Атомно-силовая микроскопия**. После иммобилизации микробных клеток поверхность ПС изучали методом атомно-силовой микроскопии (**АСМ**) с помощью зондовой нанолаборатории NtegraSpectra ("NT-MDT", Россия). Изображения поверхности ПС получали в полуконтактном режиме с помощью кремниевого зонда NSG-10. Область сканирования составляла 5 × 5 мкм (25 мкм$^2$). Обработку изображений проводили с помощью программного комплекса Gwyddion.

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)**. Подготовку препаратов для получения электронно-микроскопических снимков проводили, как описано в работе [12]. Изображения получали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 ("Carl Zeiss", Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ в Центре коллективного пользования на научном оборудовании в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии "Симбиоз" ИБФРМ РАН.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве носителя при иммобилизации микробных клеток были выбраны пленки из ПС. Для улучшения адсорбционных свойств пленок ПС

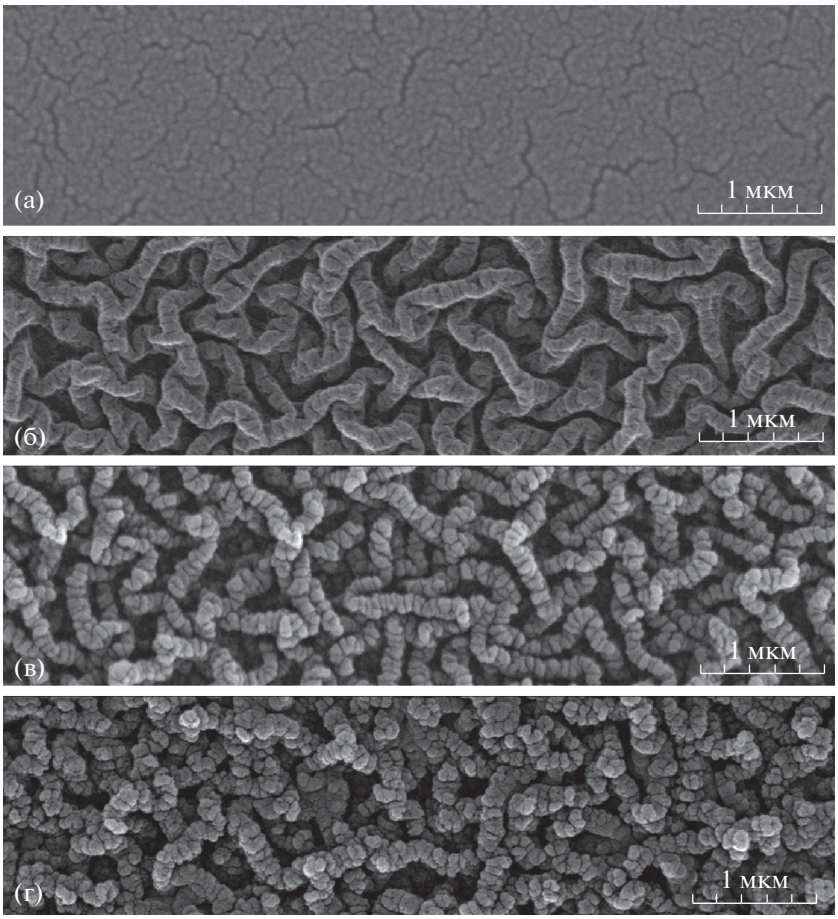


**Рис. 1.** СЭМ-изображение поверхности пленки полистирола до (а) и после обработки плазмой в течение 10 (б), 20 (в) и 30 с (г).

проводилась их обработка в плазме ВЧ разряда в течение 10, 20 и 30 с.

Как видно из рис. 1а поверхность необработанной пленки полистирола выглядела относительно гладкой. Обработка пленок ПС в плазме ВЧ разряда приводила к ее изменению (рис. 1б–1г). Поверхность образца после обработки представлена образованиями неправильной формы диаметром 0.21 и длиной 1.8 мкм. На рис. 1в–1г отчетливо видно, что поверхность имела микродоменную структуру, состоящую из последовательно соединенных частиц неправильной формы. Частицы представляли собой полимерные цепи, свернутые в клубки-глобулы, которые имели разный размер из-за разной длины полимерных цепей. Плазменная обработка образцов полимерных пленок в течение 30 с приводила к уменьшению глубины пор (рис. 1г).

После модификации пленок ПС плазменным травлением проводили оптимизацию условий иммобилизации микробных клеток трех штаммов *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* Sp59b и *E. coli* XL-1, которая включала подбор оптимальной микробной нагрузки для каждого исследуемого штамма, pH раствора, в котором проходила иммобилизация, и температуры. Также изучали влияние различного времени обработки пленок в плазме (10, 20 и 30 с) на эффективность иммобилизации биологических объектов на примере микробных клеток *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* Sp59b и *E. coli* XL-1. Оптимальное время обработки в плазме составило 30 с, так как при таком времени обработки на поверхности пленок было определено наибольшее количество микробных клеток. Были выбраны оптимальные условия адсорбции микробных клеток на пленках ПС. Так, время иммобилизации клеток составляло 15–20 мин, значение pH среды, в которой проводили сорбцию – 7.0–7.2 и количество клеток в исходной суспензии (микробная нагрузка) ~1.30–1.42 г сухих клеток/л для всех штаммов. Использование более высокого содержания клеток оказалось нецелесообразным, поскольку при этом уменьшалось количество клеток, адсорбировавшихся на носителе, а количество клеток оставшихся в свободном состоянии – увеличилось. Иммобилизацию клеток проводили при 25–27°C.

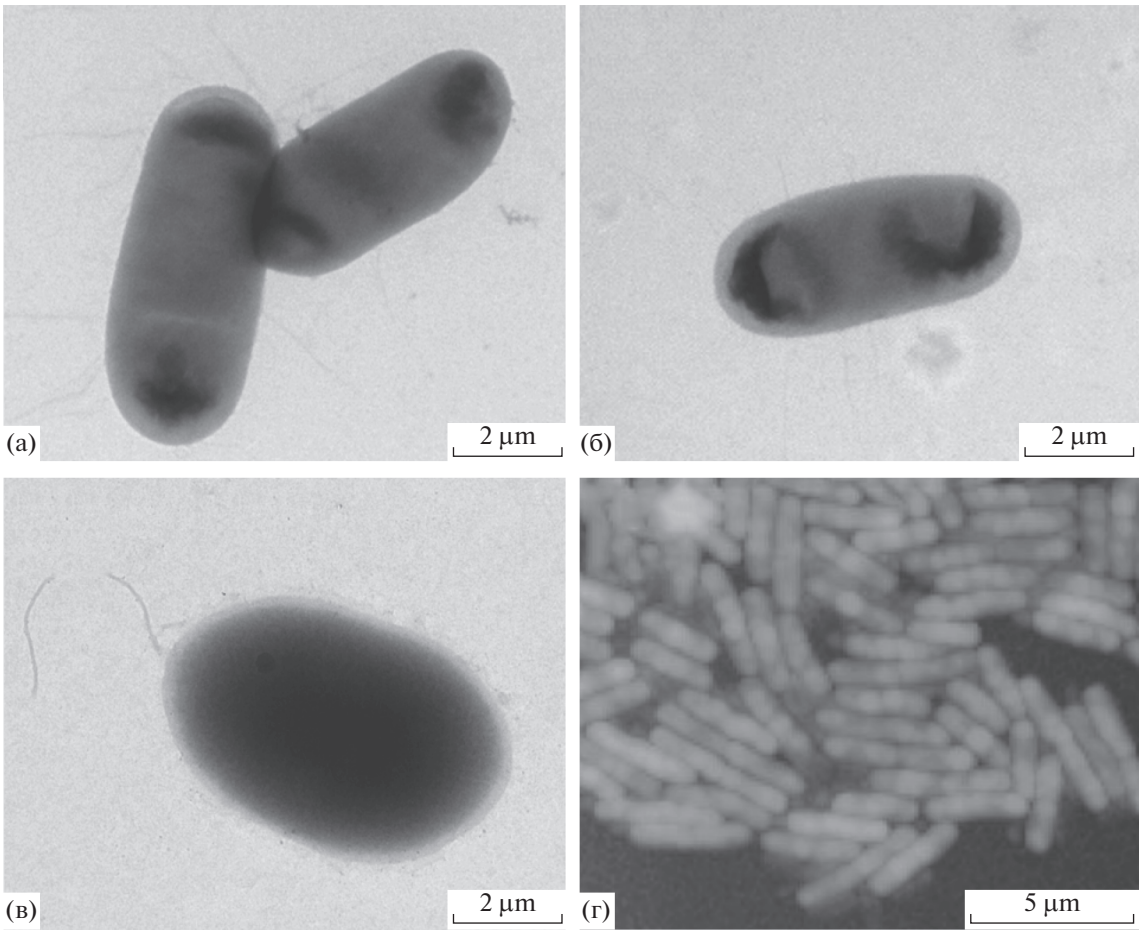


**Рис. 2.** ПЭМ-изображение свободных клеток *E. coli* XL-1 (а), *A. brasilense* Sp7 (б) и *A. lipoferum* Sp59b (в) (×10000). АСМ-изображение поверхности пленки полистирола с иммобилизованными на поверхности клетками *E. coli* XL-1 (г).

На рис. 2 представлены ПЭМ-изображения микробных клеток использованных штаммов до иммобилизации. На рис. 2г представлено АСМ-изображение поверхности полимерной пленки с иммобилизованными клетками *E. coli* XL-1, в качестве примера.

Как правило, иммобилизованные клетки сохраняют способность к размножению после их иммобилизации и длительного использования в биотехнологических процессах. При этом кинетические характеристики роста (удельная скорость роста и время удвоения) иммобилизованных клеток существенно не отличаются от аналогичных характеристик свободных клеток [1, 13].

Жизнеспособность микроорганизмов определяется, прежде всего, их способностью к делению. После иммобилизации клеток всех изученных штаммов на поверхности пленок ПС проводили микробиологическую оценку их жизнеспособности. Определяли наличие зон роста клеток после внесения полученного иммобилизованного биокатализатора с клетками в чашку Петри с плотной питательной средой LB (рис. 3а). В качестве контроля использовали пленки ПС, которые наносили на твердую питательную среду LB (рис. 3б) без предварительной иммобилизации на них клеток.

Далее каждые 14 сут определяли время сохранения жизнеспособности биокатализаторов на основе клеток *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* Sp59b и *E. coli* XL-1 в процессе их хранения при 4°C. Полученный биокатализатор, содержащий иммобилизованные клетки, в некоторых случаях сохранял активность при 4°C в течение 6 мес. (табл. 1).

Предполагают, что носитель играет роль защитного барьера для иммобилизованных клеток, “экранируя” их от негативного воздействия метаболитов, препятствуя их проникновению в матрицу. Однако, согласно результатам, полученным в работе [13], матрица носителя не является препятствием для проникновения в клетки даже таких высокомолекулярных соединений, как ДНК. Можно предположить, что одной из возможных причин длительного сохранения жизнеспособности бактерий после иммобилизации является капиллярная конденсация паров воды из окружающей среды в

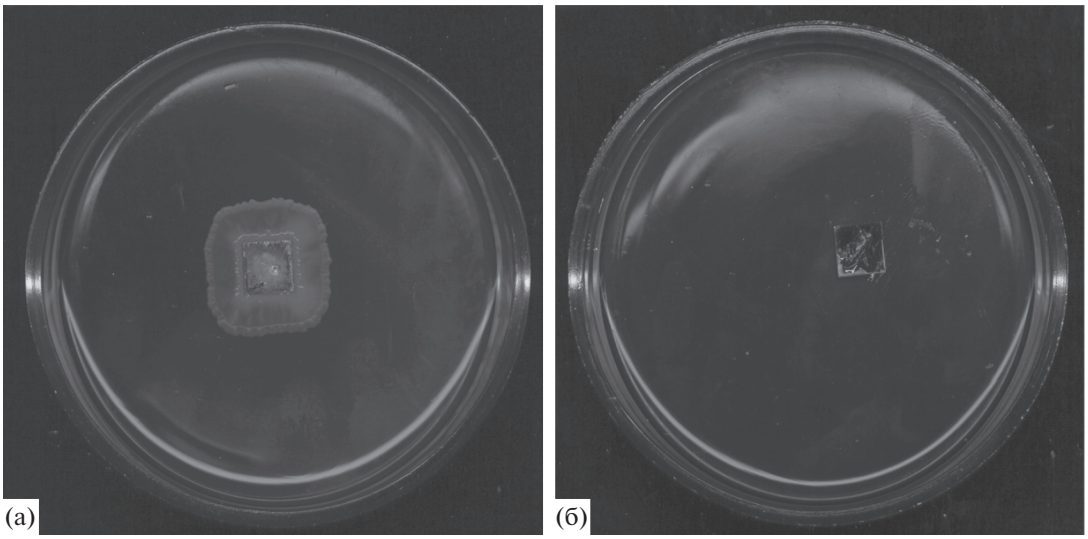


**Рис. 3.** Пленки полистирола с иммобилизованными на их поверхности клетками (а) и без них (б) на твердой питательной среде LB в чашках Петри.

порах модифицированных ПС покрытий при их хранении.

Известно, что процесс адсорбции клеток зависит от площади доступной поверхности, которая определяется размерами пор, превышающими размер микробных клеток [2]. Результаты анализа СЭМ-изображений поверхности модифицированных полистирольных покрытий показали, что пленки ПС имели пористую структуру с открытыми цилиндрическими порами радиусом $R_0$ (50–200 нм).

При капиллярной конденсации внутри капилляров модифицированных ПС-покрытий вода образовывала вогнутый мениск. При частичном заполнении капилляра (поры катализатора) жидкостью на трехфазной границе раздела жидкость–газ–твердое тело действовали поверхностные силы, которые и обусловливали существование мениска – искривленной поверхности раздела газ–жидкость. Давление насыщенного пара над искривленной поверхностью мениска $p_s$ определяется уравнением Кельвина [14]:

$$p_s = p_{s0} \exp\left(\frac{2\sigma V_m}{rRT}\right), \quad (1)$$

где $p_{s0}$ – давление насыщенного пара над плоской поверхностью, $\sigma$ – поверхностное натяжение воды на границе раздела жидкость–пар, $V_m$ – моль-

**Таблица 1.** Результаты определения жизнеспособности микробных клеток

| Микробные клетки | Время обработки носителя, с | Оценка жизнеспособности через 1–6 мес. | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | после иммобилизации | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
| *A. lipoferum* Sp59b | Без обработки | +* | + | + | + | + | + | + | –* | – | – | – | – | – |
| | 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – |
| | 20 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 30 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *A. brasilense* Sp7 | Без обработки | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – |
| | 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | – |
| | 20 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – |
| | 30 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – |
| *E. coli* Xl-1 | Без обработки | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | 10 | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – |
| | 20 | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | – | – | – |
| | 30 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | – |

* “+”/“–” – наличие/отсутствие роста клеток.

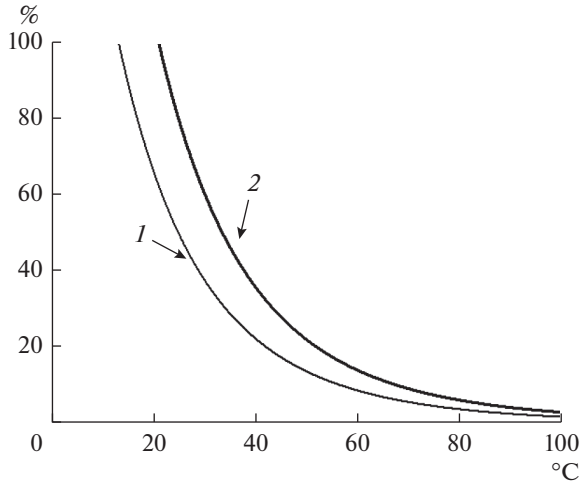


**Рис. 4.** Зависимость влажности воздуха после его охлаждения от начальной температуры 25°C и относительной влажности 50 (*1*) и 80% (*2*).

ный объем воды, $R$ – универсальная газовая постоянная, $T$ – температура окружающей среды, $r = R_0/\cos(\theta)$ – радиус мениска жидкости в капилляре, $R_0$ – радиус капилляра и $\theta$ – краевой угол смачивания водой стенок капилляра.

Состояние равновесия между жидкостью в капилляре и окружающей средой достигается при условии:

$$p_{s0}\exp\left(\frac{2\sigma\cos(\theta)V_m}{R_0RT}\right) = p_{r.h.}, \quad (2)$$

где $p_{rh} = p_{s0}\frac{r.h.}{100\%}$ – давление паров воды над плоской поверхностью и *r. h.* – относительная влажность окружающего воздуха.

Капиллярная конденсация наблюдалась в порах с критическим радиусом:

$$R_0 = \frac{RT}{2\sigma\cos(\theta)V_m}\ln^{-1}\left(\frac{r.h.}{100\%}\right). \quad (3)$$

При хранении микробного биокатализатора в условиях пониженных температур вплоть до 4°C относительная влажность воздуха существенно изменялась по сравнению с условиями хранения при комнатной температуре (25°C).

В процессе подготовки и хранения иммобилизованных на пленках ПС микробных клеток температура окружающего воздуха изохорически понижалась с комнатной до температуры хранения (с 25 до 4°C), что приводило к увеличению влажности окружающего воздуха:

$$r.h. = \frac{p}{p_0}\times 100\% = \frac{p(25)}{p_0}\frac{T}{T(25)}\times 100\%, \quad (4)$$

где $p(25)$ – давление паров воды при температуре $T(25) = 25$°C, $p$ – давление паров воды при температуре хранения $T$°C.

Учитывая, что давление паров воды при комнатной температуре определяется влажностью окружающего воздуха, получим:

$$r.h. = r.h.(25) = \frac{p_0(25)}{p_0}\frac{T}{T(25)}, \quad (5)$$

где *r. h.*(25) – относительная влажность при температуре 25°C.

Давление насыщенного водяного пара над плоской поверхностью $p_0$ зависит от температуры и приблизительно его можно определить на основании соотношения Бака [15]:

$$p_s(T) = 6.1121e^{\frac{\left(18.67\ \text{B}-\frac{T}{234}\times 5\right)T}{257.14+T}}, \quad (6)$$

где $T$ – температура в градусах Цельсия, $p_s$ – давление водяного пара в ГПа.

На рис. 4 представлена температурная зависимость влажности воздуха после его охлаждения. Видно, что охлаждение воздуха с заданной влажностью до некоторой критической температуры повышает его относительную влажность до 100%, что может приводить к конденсации паров воды.

На рис. 5 представлена зависимость критического радиуса капилляра $R_0$ от влажности окружающего воздуха *r.h.* Следует отметить, что если иммобилизованный биокатализатор с открытыми порами хранить охлажденным, то при определенной влажности в порах любых размеров наблюдается конденсация паров воды (при температуре поверхности 15°C).

Таким образом, понижая температуру хранения микробного биокатализатора можно создать условия для капиллярной конденсации влаги в порах ПС-пленки, модифицированной плазменным травлением. Конденсированная в порах полимерных матриц влага может способствовать сохранению жизнеспособности иммобилизованных на ее поверхности биологических объектов (бактерий) и сохранение их активности до 6 мес.

Результативность работы иммобилизованного биокатализатора на основе микробных клеток во многом определяется эффективностью снабжения иммобилизованных клеток питательными элементами, а также легкостью отвода метаболитов. Эти факторы зависят, главным образом, от диффузионных барьеров, создаваемых материалом носителя [16]. В основе интенсификации жизнедеятельности иммобилизованных микробных клеток лежат специфичные условия, возникающие на поверхности раздела фаз “жидкость–твердая поверхность”. Можно предположить, что граница раздела жидкости и твердого тела служит микросредой, в которой клеткам легче изменить условия своей жизнедеятельности в благоприятную для себя сторону.

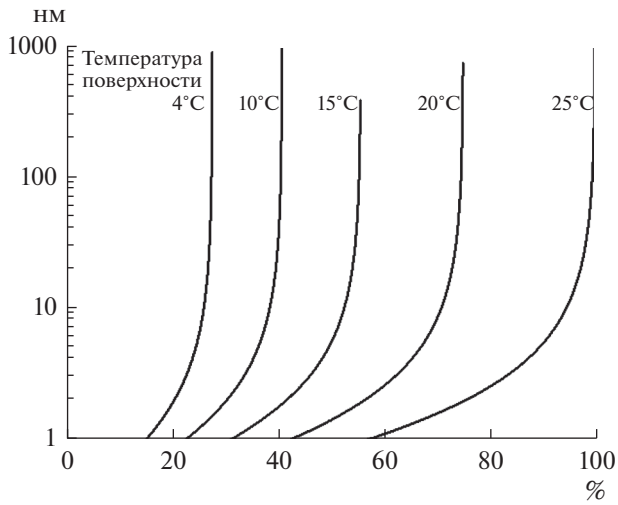


**Рис. 5.** Зависимость критического радиуса капилляра (нм) от влажности окружающего воздуха (%) при 25°C (краевой угол смачивания водой стенки капилляра составлял θ ≈ 60°).

Иммобилизованные биокатализаторы должны работать в достаточно широких диапазонах температур, значений pH, давлений, а также обеспечивать необходимую воспроизводимость в промышленных условиях. Немаловажным критерием при выборе носителя является возможность его повторного использования, что приводит к поиску дешевых и потенциально доступных материалов [22, 26]. Возможности применения органических и неорганических носителей для иммобилизации микробных клеток продемонстрированы в ряде работ [13, 17–24]. Возможности использования микробных клеток, иммобилизованных на пленках ПС, модифицированных плазменным травлением, продемонстрированы в биосенсорной детектирующей системе на основе сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора (5–8.5 ГГц) [20, 21].

Проведенное на примере клеток *A. brasilense* Sp7, *A. lipoferum* Sp59b и *E. coli* XL-1 изучение показало перспективность использования пленок ПС для иммобилизации с возможностью их многократного использования. Преимущества данного носителя – простота иммобилизации (путем адсорбции) и короткое время для иммобилизации клеток (~20 мин), при этом процесс обработки ПС в плазме составлял ~30 с, а микробные клетки после иммобилизации сохраняли жизнеспособность до 6 мес.

Полученные результаты представляют интерес с практической точки зрения для применения полимерных покрытий, модифицированных плазменным травлением, в качестве носителя для иммобилизации клеток при создании биосенсоров.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-29-23042-мк и 19-07-00304).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I.M.K., Moawad H., ABD-El-Ghany S.* // Pol. J. Microbiol. 2011. V. 60. № 2. P. 133–138.
2. *Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский ВИ., Спасов С.Д.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Издательство Московского университета, 1994. 288 с.
3. *Arslan F., Ustabaş S., Arslan H.* // Sensors. 2011. V. 11. № 8. P. 8152–8163.
4. *Tsui O.K.C.* Polymer Thin Films. / Eds. Tsuiand O.K.C., Russell T.P. Singapore: World Sci, 2008. P. 267–294.
5. *Otero T.F.* Polymer Sensors and Actuators. / Eds. Osada Y., De Rossi D.E. Berlin: Springer, 2000. P. 295–324.
6. *Шереметьев С.В., Штейнберг Е.М.* Использование функциональных полимеров в медицине. Казань: СибАК, 2012. 145 с.
7. *Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N.* // Mat. Sci. Eng. R. 2002. V. 36. № 5. C. 143–206.
8. *Jacobs T., Morent R., De Geyter N., Dubruel P., Leys C.* // Plasma Chem. Plasma P. 2012. T. 32. № 5. C. 1039–1073
9. *Hagiwara K., Hasebe T., Hotta A.* // Surface and Coatings Technology. 2013. V. 216. P. 318–323.
10. *van Kooten T.G., Spijker H.T., Busscher H.J.* //Biomaterials. 2004. V. 25. №. 10. P. 1735–1747.
11. *Smirnov A.V., Atkin V.S., Gorbachev I.A., Grebennikov A.I., Sinev I.V., Simakov V.V.* // BioNanoScience. 2017. T. 7. № 4. C. 680–685.
12. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A., Staroverov S.A., Fomin A.S.* // Talanta. 2018. V. 178. P. 569–576.
13. *Крякунова Е.Д., Канарский А.В.* // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. № 17. С. 189–194.
14. *Adamson A.W., Gast A.P.* Physical Chemistry of Surfaces. 6th Ed. Wiley.1997. 808 p. ISBN: 978-0-471-14873-9.
15. *Buck A.L.* // J. Appl. Meteorol. 1981. V. 20. № 12. P. 1527–1532.
16. *Писарев О.А., Ежова Н.М.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. № 4. С. 535–552.
17. *Almeida C., Branyik T., Moradas-Ferreira P., Teixeira J.* // J. Biosci. Bioeng. 2003. V. 96. № 6. P. 513–518.
18. *Kumar S.S., Ghosh A.R.* // Microbiology. 2019. V. 165. № 6. P. 593–610.
19. *Gui Q., Lawson T., Shan S., Yan L., Liu Y.* // Sensors. 2017. V. 17. № 7. P. 1623. https://doi.org/10.3390/s17071623
20. *Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Смирнов А.В., Караваева О.А., Бородина И.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 6. С. 642–650.
21. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Smirnov A.V., Karavaeva O.A., Borodina I.A.* // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 130. № 4. P. 95–102
22. *Longo G., Alonso-Sarduy L., Marques Rio L., Bizzini A., Trampuz A., Notz J., Dietler G. and Kasas S.* // Nat. Nanotechnol. 2013. V. 8. № 7. P. 522–526.
23. *Su L., Wenzhao J., Changjun H.* // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. № 5. P. 1788–1799.
24. *Bilal M., Iqbal H.M.N.* // Process Safety and Environmental Protection 2019. V. 124.P. 8–17.

# Immobilization of Microbial Cells on Polymeric Matrices Modified by Plasma Treatment

**O. I. Guliy[a, b, *], V. V. Simakov[c], O. A. Karavaeva[a], and A. V. Smirnov[d]**

[a] *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

[b] *Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia*

[c] *Chernyshevsky National Research State University, Saratov, 410005 Russia*

[d] *Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, RAS, Moscow, 125009 Russia*

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

Received September 5, 2019; revised October 15, 2019; accepted November 1, 2019

The possibility of immobilization of microbial cells on polymer matrices modified by plasma treatment has been shown. By the example of microbial cells *Azospirillum brasilense* Sp 7, *A. lipoferum* Sp59b and *Escherichia coli* XL-1, it was found that the immobilization efficiency of biological objects depends on the time processing of films in plasma. Treatment process a polystyrene film in a high-frequency discharge plasma made it possible to significantly increase the lifetime of microbial cells immobilized on its surface. It was shown that the optimal time for processing films in plasma was 30 s, the time for immobilization of microbial cells was ~20 min, and after immobilization, microbial cells remained viable for up to 6 months. The use of modified matrices by plasma treatment as a carrier of immobilized microbial cells to production biosensors is proposed.

*Keywords:* immobilization, microbial cells, polystyrene films, plasma treatment, capillary condensation

*ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2020, том 56, № 2, с. 206–208*

# ПАМЯТИ КОНСТАНТИНА ГЕОРГИЕВИЧА СКРЯБИНА (1948–2019)

**DOI:** 10.31857/S0555109920020166

После тяжелой болезни 5 ноября 2019 г. ушел из жизни крупнейший российский ученый с мировым именем, внесший принципиальный вклад в становление и развитие современной отечественной биотехнологии, основатель и научный руководитель Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук академик РАН Константин Георгиевич Скрябин.

К.Г. Скрябин – выпускник биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, ученик академика А.А. Баева, выдающегося молекулярного биолога. В 1976–1977 гг. К.Г. Скрябин проходил стажировку в Гарвардском университете в лаборатории будущего нобелевского лауреата Вальтера Гилберта, изобретателя метода определения последовательности ДНК. Овладение этими новыми для отечественной науки методами позволило К.Г. Скрябину в дальнейшем организовать работу по секвенированию нуклеотидных последовательностей ДНК в нашей стране в 1970–80 гг. Эти работы получили широкое признание и были отмечены Премией Ленинского комсомола (1980 г.), Государственной премией СССР (1983 г.). В дальнейшем результаты этих работ стали основой фундаментальных исследований академика К.Г. Скрябина в области структурной и функциональной геномики, изучения взаимосвязи организации генетического материала и его экспрессии.

Ему принадлежат выполненные в 80-е годы прошлого столетия в соавторстве с другими выдающимися отечественными учеными классические работы по установлению нуклеотидных последовательностей ряда важнейших локусов и генетических элементов про- и эукариот, в том числе рибосомного повтора дрожжей-сахаромицетов, ретроэлементов геномов мыши и дрозофилы, рибофлавинового оперона бацилл, геномов бактериофагов, *X*-вируса картофеля, генов глазных белков земноводных и т.д. Эти исследования дали мощный импульс дальнейшим разработкам в области изучения структуры и функции рибосом эукариот, биологии мобильных элементов, механизмов регуляции экспрессии генов у микроорганизмов, исследованиям по фитовирусологии, регуляции экспрессии генов в растениях и т.д.

Неутомимая энергия, яркий организаторский талант, обостренное чувство нового, редкая способность к успешному прогнозированию будущих актуальных направлений в науках о жизни не позволяли К.Г. Скрябину останавливаться и успокаиваться на достигнутом. Он всегда стремился к новым горизонтам, увлекая за собой коллег и соратников.

В период работы в отделе академика А.А. Баева в Институте молекулярной биологии АН СССР им был инициирован цикл исследований по разработке систем гетерологичной экспрессии ряда белков, значимых в прикладном и фундаментальном аспектах – гормонов и факторов роста человека и сельскохозяйственных животных, вирусных антигенов, рибонуклеаз и пр. Результаты этих работ, отраженные в многочисленных публикациях и патентах, стали во многом пионерскими для нашей страны и надолго определили судьбу ряда самостоятельных исследовательских направлений.

В конце 80-х годов особое внимание К.Г. Скрябина привлекали проблемы молекулярной биологии и генетической инженерии растений. Под его руководством впервые в нашей стране были созданы устойчивые к гербицидам и вирусам трансгенные варианты отечественных сортов картофеля и хлопчатника, получены данные об организации и экспрессии генов запасных белков зерновых и бобовых, разработаны методы диагностики вирусных болезней картофеля. Эти исследования, поддержанные международными и российскими гранта-

ми и программами, были успешно развиты в последующие годы в Центре “Биоинженерия” РАН.

Широкие научные интересы К.Г. Скрябина далеко не исчерпывались перечисленным: ему принадлежат важные и актуальные работы по нанобиотехнологии, конструированию вирусоподобных и магнитных частиц, по оценке безопасности наночастиц и наноматериалов. Плодотворное сотрудничество с “НИИ гриппа” Минздрава России позволило создать эффективную противогриппозную “нановакцину”, используя технологию конструирования биологически активных наночастиц на основе капсидных белков вируса *X* картофеля, вируса мозаики цветной капусты и ядерного антигена вируса гепатита В. Новые методы получения “нановакцин” были развернуты за счет использования рекомбинантных вирусных векторов в растениях (совместно с биологическим факультетом МГУ им. М.В. Ломоносова).

Развивая исследования в системной биологии, К.Г. Скрябин внес неоценимый вклад в понимание молекулярных основ опухолевой трансформации клеток эпителия почек человека. Он стал одним из первых представителей России, кто принял участие в работе крупнейшего международного консорциума по изучению раковых геномов (International Cancer Genome Consortium). Его усилиями в сотрудничестве с ведущими европейскими и отечественными онкологами, молекулярными биологами и биоинформатиками были получены данные, характеризующие спектр соматических мутаций клеток рака почки. Эти результаты опубликованы в ведущих международных научных изданиях.

Первая декада 21 века была отмечена революционными изменениями в технологиях полногеномного секвенирования. Методы так называемого “секвенирования следующего поколения” в корне изменили представление ученых-медиков о возможностях профилактики, лечения и реабилитации, проводимых с учетом персональной генетической информации пациента. По инициативе К.Г. Скрябина в 2008 г. сформировался коллектив ученых, стремящихся использовать технологии NGS в своей научной работе и в 2009 г. руководство ФИЦ “Курчатовский институт” приняло решение организовать геномный центр в рамках развития конвергентных наук в НБИКС-Центре. К.Г. Скрябин возглавил вновь созданную лабораторию и руководил ею на протяжении пяти лет до конца 2013 г. В последние годы К.Г. Скрябин работал заместителем директора Национального исследовательского Центра “Курчатовский Институт”, координируя работы НБИКС Центра в области структурной биологии, нанобиотехнологии, геномики и расшифровки структур белков.

Талантливый организатор, К.Г. Скрябин в кратчайшие сроки вывел геномную инфраструктуру ФИЦ “Курчатовский институт” на мировой уровень, что позволило впервые в России секвенировать персональный геном человека (восьмой в мире на тот момент). Эти достижения предопределили возможность перехода к персонализированной медицине, затем последовали работы по изучению генома пациентов с наследственными формами болезни Альцгеймера (совместно с учеными из МГУ им М.В. Ломоносова), и с каверномами головного мозга (совместно с Национальным медицинским исследовательским центром им. Н.Г. Бурденко при участии академика РАН А.Н. Коновалова).

Отдельно стоит упомянуть роль Скрябина К.Г. в этногенетических исследованиях, которые позволили внести существенный вклад в понимание генофонда этнических групп, населяющих Россию. Именно Константин Георгиевич впервые в нашей стране в 2009 г. применил технологии полногеномного анализа для популяционных групп.

Его научные интересы охватывали также область исследования древней ДНК. Так, в 2015 г. была проведена работа по секвенированию полных митохондриальных геномов людей каменного века, что указало на возможную связь новосвободненской культуры северного Кавказа с североевропейской культурой воронковидных кубков.

Совсем недавние работы Скрябина К.Г., проведенные на исследовательской базе Центра планирования семьи и репродукции человека Департамента здравоохранения г. Москвы по созданию оригинального метода определения уровня свободно циркулирующей в крови матери ДНК плода, открыли возможность внедрения в России отечественной медицинской технологии неинвазивного пренатального теста. Он обеспечивает раннее и надежное выявление хромосомных аномалий плода, в частности, синдромов Дауна, Патау и Эдвардса.

К.Г. Скрябин был выдающимся организатором отечественной науки. В 1989 г. он стал инициатором создания центра “Биоинженерия” при Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, а в 1991 г. основал Центр “Биоинженерия” РАН. На протяжении 25 лет Центр был флагманом отечественных разработок в области геномики, постгеномных биотехнологий, генетической инженерии, биотехнологии физиологически-активных веществ, обеспечения биобезопасности. В 2015 г. по инициативе К.Г. Скрябина был создан Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, научным руководителем которого он стал.

Нельзя не отметить большую роль академика РАН К.Г. Скрябина в создании российской си-

стемы регулирования в области генно-инженерной деятельности. Он стал одним из инициаторов и непосредственных разработчиков базового для России, рамочного Федерального закона № 86-ФЗ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности" (1996 г.). До настоящего времени Закон является точкой отсчета в работе над совершенствованием отечественного законодательства в сфере наук о жизни.

Многогранную научную деятельность К.Г. Скрябин успешно сочетал с общественной и научно-педагогической работой: он был основателем ведущей научной школы в области геномики, а с 2010 г. заведовал кафедрой биотехнологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Более 10 лет академик К.Г. Скрябин был членом Совета при Президенте Российской Федерации по науке и образованию, участвовал в подготовке и реализации ряда важнейших научно-технических программ Российской Федерации.

Большая работа проведена им также на посту председателя Научного Совета РАН по биотехнологии и в других Советах и комиссиях РАН, Министерства образования и науки России, Министерства сельского хозяйства России и др.

За рубежом К.Г. Скрябин был избран Ассоциированным членом Европейской молекулярно-биологической Организации (EMBO), членом редколлегий ведущих российских и зарубежных научных журналов. Будучи российским представителем в рабочих группах Организации экономического сотрудничества и развития ООН, он на деле реализовывал политику "научной дипломатии", устанавливая партнерское научное сотрудничество с зарубежными лидерами в биотехнологии, организуя в стране международные научные конференции, поддерживая в мире авторитет российской науки.

Выдающиеся заслуги К.Г. Скрябина в развитии науки и отечественной биотехнологии были отмечены орденом "Дружбы народов", медалью к ордену "За заслуги перед Отечеством" II степени, а затем и орденом "За заслуги перед Отечеством" IV (2008 г.) и III (2019 г.) степени. Константин Георгиевич – лауреат премии Ленинского комсомола, Государственной премии СССР в области науки и техники, премии Правительства РФ 2013 г. в области науки и техники. Г.К. Скрябин был офицером Ордена Академических Пальм Франции.

За выдающиеся работы в области геномики и геноинформатики, К.Г. Скрябин в 2019 г. был удостоен Премии имени академика А.А. Баева Российской академии наук. Академик РАН К.Г. Скрябин – офицер Ордена Академических пальм Франции.

Коллеги, ученики и друзья сохранят светлую память о Константине Георгиевиче, выдающемся ученом, талантливом и смелом созидателе, ярком, замечательном человеке.

*ФИЦ Биотехнологии РАН*

*Редколлегия журнала*