СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 3, 2021

Роль бактерий рода *Pseudomonas* в устойчивом развитии агросистем и защите окружающей среды (обзор)

Т. Ю. Коршунова, М. Д. Бакаева, Е. В. Кузина, Г. Ф. Рафикова, С. П. Четвериков, Д. В. Четверикова, О. Н. Логинов 211

Получение химозина белухи (*Delphinapterus leucas*) в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii* и характеристика рекомбинантного фермента

С. Ю. Филькин, Н. В. Чертова, С. С. Зацепин, Э. Г. Садыхов, А. Н. Фёдоров, А. В. Липкин 228

Плазмиды деградации хлорфеноксиуксусных кислот бактерий рода *Raoultella*

Н. В. Жарикова, Т. Р. Ясаков, Е. Ю. Журенко, В. В. Коробов, Т. В. Маркушева 235

Реконструкция HYDSL гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* BBS после ингибирования цианидом

Н. А. Зорин, А. Н. Хуснутдинова, А. С. Стародубов, И. И. Проскуряков, А. А. Цыганков 245

Характеристика нового штамма *Xanthomonas campestris* M 28– продуцента ксантана, исследование генома, условий культивирования и физико-химических и реологических свойств полисахарида

В. В. Ревин, Е. В. Лияськина, Б. В. Покидько, Н. В. Пименов, А. В. Марданов, Н. В. Равин 251

Влияние трансглютаминазы на свойства пленок на основе хитозана и желатина

Д. А. Кадималиев, О. В. Парчайкина, И. В. Сюсин, И. В. Чаиркин, А. Н. Малафеев, А. А. Девяткин, В. В. Ревин 262

Модифицированный гидрогель – носитель перорального инсулина

Л. И. Валуев, И. Л. Валуев, Л. В. Ванчугова, И. В. Обыденнова 270

Исследование антимикробных свойств препаратов на основе сополимера малеиновой кислоты, содержащих наночастицы серебра и остатки фенола

Н. А. Самойлова, М. А. Краюхина, Н. М. Анучина, Д. А. Попов 274

Роль модификации синтеза NO в реализации защитного действия путресцина на проростки пшеницы при тепловом стрессе

Ю. Е. Колупаев, А. И. Кокорев, М. А. Шкляревский, А. А. Луговая, Ю. В. Карпец, О. Е. Иванченко 282

Рекомбинантные антигены E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа: получение, очистка, оценка иммуногенности и противоопухолевого эффекта *in vivo*

М. Е. Субботина, Т. М. Грунина, О. В. Сергиенко, Н. В. Елкина, Д. С. Елкин, М. В. Новикова, П. Б. Копнин, С. В. Винокурова 291

Иммунохроматографические тест-системы для детекции микроцистина-LR в морепродуктах

Е. А. Зверева, О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев 303

Логинов Олег Николаевич (17.05.1963–21.12.2020) 311

CONTENTS

Vol. 57, No. 3, 2021

The Role of *Pseudomonas* Bacteria in Sustainable Development of Agrosystems and Protection of the Environment (Review)
T. Yu. Korshunova, M. D. Bakaeva, E. V. Kuzina, G. F. Rafikova, S. P. Chetverikov, D. V. Chetverikova, and O. N. Loginov 211

Preparation of Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*) Chymosin in the Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii* and Characterization of the Recombinant Enzyme
S. Yu. Filkin, N. V. Chertova, S. S. Zatsepin, E. G. Sadykhov, A. N. Fedorov, and A. V. Lipkin 228

Chlorophenoxyacetic Acid Degradation Plasmids of Bacteria of the Genus *Raoultella*
N. V. Zharikova, T. R. Iasakov, E. Yu. Zhurenko, V. V. Korobov, and T. V. Markusheva 235

Reconstruction of Cyanide Treated HydSL Hydrogenase from Thiocapsa roseopersicina
N. A. Zorin, A. N. Khusnutdinova, A. S. Starodubov, I. I. Proskuryakov, and A. A. Tsygankov 245

Characterization of Novel Xanthan-Producing Bacterial Strain *Xanthomonas campestris* M 28
V. V. Revin, E. V. Liyas'kina, B. V. Pokidko, N. V. Pimenov, A. V. Mardanov, and N. V. Ravin 251

Effect of Transglutaminase on the Properties of Films Prepared from Chitosan and Gelatin
D. A. Kadimaliev, O. V. Parchaykina, I. V. Syusin, I. V. Chairkin, A. N. Malafeev, A. A. Devyatkin, and V. V. Revin 262

Modified Hydrogel – Carrier of Oral Insulin
L. I. Valuev, I. L. Valuev, L. V. Vanchugova, and I. V. Obydennova 270

Investigation of Antimicrobial Properties of Praparations Based on Maleic Acid Copolymers Containing Silver Nanoparticles and Phenolic Residues
N. A. Samoilova, M. A. Krayukhina, N. M. Anuchina, and D. A. Popov 274

The Role of NO Synthesis Modification in the Implementation of the Protective Effect on Wheat Seedlings under Heat Stress by Putrescine
Yu. E. Kolupaev, A. I. Kokorev, M. A. Shkliarevskyi, A. A. Lugovaya, Yu. V. Karpets, and O. E. Ivanchenko 282

Recombinant Antigens E6 and E7 of Human Papillomavirus Type 16: Preparation, Purification, Evaluation of Immunogenicity and Antitumor Effect *in vivo*
M. E. Subbotina, T. M. Grunina, O. V. Sergienko, N. V. Elkina, D. S. Elkin, M. V. Novikova, P. B. Kopnin, and S. V. Vinokurova 291

Immunochromatographic Test Systems for the Detection of Microcystin-LR in Seafood
E. A. Zvereva, O. D. Hendrickson, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev 303

In memory of Oleg Nicolaevich Loginov (17.05.1963–21.12.2020) 311

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 211–227

УДК 579.6

РОЛЬ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* В УСТОЙЧИВОМ РАЗВИТИИ АГРОСИСТЕМ И ЗАЩИТЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (ОБЗОР)

© 2021 г. Т. Ю. Коршунова[1], *, М. Д. Бакаева[1], Е. В. Кузина[1], Г. Ф. Рафикова[1], С. П. Четвериков[1], Д. В. Четверикова[1], О. Н. Логинов[1]

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

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

Поступила в редакцию 03.11.2020 г.
После доработки 18.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Применение специализированных культур микроорганизмов и биопрепаратов на их основе – наиболее приемлемый способ решения таких актуальных проблем, как повышение урожайности и защита растений от болезней, а также ликвидация последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Современной тенденцией развития сельскохозяйственной и экологической биотехнологии является использование микроорганизмов, обладающих комплексом полезных свойств. К таковым относятся представители рода *Pseudomonas*, многие из которых способны к стимуляции роста и развития растений, подавлению фитопатогенных организмов, деструкции различных по своей структуре углеводородов, проявлению активности в широком диапазоне температур, продукции биосурфактантов и др. В обзоре показано, что поиск и изучение активных штаммов псевдомонад представляет значительный интерес с точки зрения возможности их широкого применения, как в аграрной, так и рекультивационной практике.

Ключевые слова: бактерии рода *Pseudomonas*, PGPB, агенты биологического контроля, нефтедеструкция, азотфиксация, биосурфактанты, биопрепараты

DOI: 10.31857/S0555109921030089

В современных условиях перед человечеством на первом месте по актуальности стоят проблемы, связанные с эффективным развитием сельского хозяйства и обеспечением продовольственной безопасности, а также очистки окружающей среды от антропогенных поллютантов. Интенсивное агропроизводство подразумевает широкую химизацию земледелия, что, зачастую, пагубно сказывается на качестве урожая и состоянии экосистемы в целом. В рамках перехода к органическому сельскому хозяйству предлагается минимизация использования пестицидов и удобрений в пользу альтернативных экологически безопасных систем землепользования, в том числе биотехнологических способов защиты и стимулирования роста растений, основанных на применении микробных препаратов.

Увеличение объемов добычи углеводородного сырья приводит к масштабной контаминации природных сред нефтью, продуктами и отходами ее переработки, которые негативно влияют на их физико-химические и биологические свойства и оказывают как прямое, так и опосредованное отрицательное воздействие на живые организмы. Наиболее приемлемым с экологической и экономической точки зрения способом очистки является включение указанных загрязнителей в естественный обмен веществ и энергии с участием микроорганизмов-деструкторов, осуществляющих их минерализацию.

Представителей рода *Pseudomonas* относят к числу наиболее подходящих и перспективных объектов как сельскохозяйственной, так и экологической биотехнологии. Помимо широкого распространения в окружающей среде, их преимуществом является высокая технологичность. Они поддерживают достаточную численность на минимальных питательных средах, характеризуются высокой скоростью размножения, интенсивным биосинтезом необходимых веществ, минимальным образованием побочных продуктов, безвредностью для человека и окружающей среды. Также для их культивирования возможно использование дешевого сырья (например, отходов других производств). Штаммы псевдомонад могут обладать одним или несколькими полезными для растений свойствами, такими как: способность подавлять фитопатогены, положительно влиять на рост и развитие растений, а также запускать в растениях собственные механизмы защиты от раз-

личных неблагоприятных факторов. Эти бактерии являются активными деструкторами из-за наличия ферментных систем, обладающих широкой субстратной специфичностью и катализирующих реакции биотрансформации практически всех классов органических соединений в значительном диапазоне концентраций и условий среды. Кроме того, они продуцируют биосурфактанты, способствующие диспергированию и солюбилизации гидрофобных веществ, углеводородов, в частности. В последнее время при разработке подходов к ремедиации почв особое внимание уделяется полифункциональным штаммам псевдомонад, сочетающим фитостимуляцию и способность к биодеградации поллютантов. Поэтому неудивительно, что ученые всего мира ведут интенсивный поиск активных штаммов рода *Pseudomonas* и разработку на их основе биопрепаратов для растениеводства и очистки экосистем от нефтяного загрязнения.

СВОЙСТВА ПСЕВДОМОНАД КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГРУППЫ PGPB

Мировая тенденция сокращения доз внесения агрохимикатов и переход к органическому земледелию стимулирует поиск и использование в растениеводстве новых, дополнительных источников минерального питания и альтернативных способов увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур и защиты их от фитопатогенов. Оптимальным выбором может стать применение стимулирующих рост растений бактерий (**PGPB**, plant growth promoting bacteria) и содержащих их биопрепаратов [1, 2].

Прямое действие PGPB на растения связывают с такими их свойствами, как повышение доступности элементов минерального питания [3, 4]; продукция метаболитов с гормональными, сигнальными и другими функциями, регулирующими рост [5–7]; индукция механизмов системной устойчивости к стрессам абиотической и биотической природы [8, 9]. PGPB могут влиять на растения и опосредованно, что проявляется в вытеснении и подавлении развития фитопатогенных организмов и снижении содержания в почве вредных химических соединений и тяжелых металлов [10, 11]. Все вышеперечисленные особенности характерны для многих представителей рода *Pseudomonas*, способных успешно колонизировать ризосферу растений и выживать в ней [12–14].

Псевдомонады секретируют целый ряд соединений, стимулирующих рост растений, таких как фитогормоны и сидерофоры [15]. Наиболее хорошо изучена способность к выработке гормонов ауксинов (преимущественно индолил-3-уксусной кислоты, **ИУК**), стимулирующих деление, удлинение и дифференциацию клеток [16, 17]. Ауксинпродуцирующие штаммы, такие как *P. mendocina* и *P. alcaliphila* улучшали всхожесть семян, показатели роста и урожайности растений пшеницы [18]; *P. fluorescens* – увеличивали длину и массу корней и побегов растений лука [19]; *Pseudomonas* sp. и *P. aeruginosa* – вызывали усиление роста у растений *Arabidopsis thaliana* [20]. Применение синтезирующих ИУК штаммов *Pseudomonas* повышало урожайность пшеницы в условиях засухи [21]. Однако способность к образованию этих гормонов обнаружена также и у фитопатогенных псевдомонад, вырабатывающих их в значительном количестве [22, 23].

Бактерии рода *Pseudomonas* продуцируют цитокинины, которые регулируют многие физиологические процессы: стимулируют деление растительных клеток и прорастание семян, прерывают период покоя спящих почек, задерживают старение срезанных листьев, повышают устойчивость клеток к различным неблагоприятным факторам [24, 25]. За счет их синтеза штаммы *P. fluorescens* AK1 и *P. aeruginosa* AK2 усиливали рост проростков риса [26], а *P. fluorescens* G20-18 эффективно контролировал инфекцию *P. syringae* у растений рода *Arabidopsis*, поддерживая целостность тканей и, в конечном счете, выход биомассы [27].

Гиббереллины. Гиббереллины индуцируют деление растительных клеток, стимулируют прорастание семян, увеличивают их всхожесть, способствуют раннему цветению и завязыванию плодов. Многие представители рода *Pseudomonas*, образующие указанные фитогормоны [28, 29], как было показано, положительно влияют на рост и развитие растений сои, даже в условиях засухи и засоления [30], салата-латука [31], пшеницы и нута [32].

Выявлены штаммы псевдомонад, обладающие комплексной фитогормональной активностью. Например, *P. stutzeri* MTP40, *P. putida* MTP50 и *P. putida* УКМ B-398 секретируют ИУК, цитокинины и гиббереллины. Такие микроорганизмы имеют большой потенциал для применения в растениеводстве и, безусловно, нуждаются в дальнейшем изучении [33, 34].

Абсцизовая кислота (**АБК**). АБК также участвует в созревании и прорастании семян, регуляции газообмена и водного баланса у растений, индуцируя процесс закрывания устьиц. Также АБК инициирует адаптивные изменения, происходящие под влиянием абиотических стрессовых факторов. Известны продуцирующие АБК штамм *P. fluorescens* Rt6M10, который смягчал стресс у растений винограда, уменьшая потери воды [35], и *P. putida* Rs-198, способствующий накоплению биомассы растений хлопчатника в условиях засоления почвы [36].

Железо. Железо является функциональной составляющей ферментных систем растений. Оно участвует в метаболизме нуклеиновых кислот, окислительном и энергетическом обменах, в образовании хлорофилла, а также необходимо для

протекания биохимических процессов, происходящих во время дыхания и фотосинтеза. При его дефиците в среде в микробных клетках происходит синтез сидерофоров – низкомолекулярных веществ различной природы (гидроксаматы, α-гидроксикарбоксилаты, катехолы и пиовердины), которые переводят связанное железо в доступную для микроорганизмов ионную форму Fe^{3+}, тем самым облегчая транспорт этого микроэлемента, как в клетки бактерий, так и в клетки корня. Кроме того, сидерофоры играют важную роль в подавлении различных заболеваний, лишая фитопатогены железа, в результате чего их рост замедляется. Способность к продукции сидерофоров очень широко распространена среди псевдомонад [37, 38]. Их образование присуще и патогенным псевдомонадам, в частности, *P. aeruginosa* [39]. Однако штамм *P. aeruginosa* FP6 за счет этой особенности оказался эффективным агентом биоконтроля *Rhizoctonia solani* и *Colletotrichum gloeosporioides*, вызывающих заболевания растений перца чили [40].

Азотфиксация. Имеется много данных о наличии у представителей рода *Pseudomonas* азотфиксирующей активности [41, 42]. Растения нуждаются в этом элементе в очень больших количествах, поскольку являясь составной частью аминокислот, из которых синтезируются белки, он играет важную роль практически во всех метаболических процессах в растительных клетках. При обработке различных бобовых и не бобовых культур диазотрофными псевдомонадами установлено усиление депонирования азота в их тканях и увеличение урожайности [43–45]. Обнаружено положительное действие ауксинпродуцирующих, азотфиксирующих бактерий *P. putida* и *P. fluorescens* на рост и урожайность зерновых и корнеплодных растений, за счет улучшения их минерального, в том числе азотного, питания и увеличения выноса урожаем микроэлементов из почвы. Это позволило уменьшить дозы вносимых минеральных удобрений в 1.5–3 раза без потерь биомассы [46].

Фосфор. Фосфор является вторым после азота ключевым элементом для растений с точки зрения значимости и количественной потребности, а также важен для формирования зачатков репродуктивных частей и ветвления корней. Хотя он присутствует в почве в различных формах, но только 0.1% от его общего количества доступно растениям из-за плохой растворимости. Кроме того, растения могут использовать очень небольшую часть такого фосфора, поскольку 75–90% его осаждается при образовании комплексов с металлами. Поэтому солюбилизация и минерализация этого элемента является важной особенностью PGPB, которая обнаружена у многих бактерий рода *Pseudomonas* [47–49]. Предпосевная обработка семян пшеницы бактериями *P. extremaustralis* IB-Ki-13-1A, у которых сочеталась значительная способность к растворению фосфатов и продукции ауксинов, дала существенную прибавку урожая [50], а три штамма *P. putida,* характеризующиеся такими же свойствами, оказывали стимулирующее влияние на рост растений мяты перечной и выход эфирного масла [51]. Однако псевдомонады, обладающие азотфиксирующей и фосфатмобилизирующей активностью (как и любые другие PGPB), не являются полной альтернативой минеральным удобрениям. Как правило, продуктивность сельскохозяйственных культур, инокулированных ими, ниже, чем при внесении химических соединений. Как уже отмечалось, целесообразность их использования связана, в первую очередь, с расходом меньшего количества минеральных удобрений [46].

Псевдомонады индуцируют устойчивость растений к абиотическому стрессу. Так, показано положительное влияние *Pseudomonas* spp. на засухоустойчивость, рост, накопление биомассы растений кукурузы и пшеницы [21, 52], на массу корня и побегов кукурузы в условиях солевого стресса и высокой температуры [53], а также на прорастание семян и выживаемость растений *Arabidopsis thaliana* при засолении [54]. Штаммы вида *P. fluorescens* увеличивали соле- и засухоустойчивость, растворимость фосфатов, рост, сухую биомассу, способность к поглощению питательных веществ и устойчивость к бактериальным и грибным патогенам растений пшеницы [55, 56], а также толерантность к свинцу, рост и урожайность подсолнечника [57]. Штамм *P. brassicacearum* положительно влиял на рост в присутствии тяжелых металлов (меди), массу корней, общую сухую биомассу, нодуляцию корней люцерны [58]; *P. frederiksbergensis* – на солеустойчивость и рост растений перца [59].

Способы положительного воздействия псевдомонад на растения весьма разнообразны и многие из этих бактерий обладают комплексным действием. Так, использование *P. libanensis* TR1 приводило к увеличению биомассы и урожайности, термо-, соле- и засухоустойчивости растений вигны. Изолят фиксировал азот, солюбилизировал фосфор, а также вырабатывал сидерофоры, ИУК и аммиак. Бактерии *P. reactans* Ph3R3 синтезировали ИУК, сидерофоры и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазу (**АЦК-деаминазу**). Оба эти штамма проявляли высокую устойчивость к тяжелым металлам, антибиотикам, солености, засухе и экстремальным температурам. Как показано Ма с соавт. [10, 60], инокуляция ими значительно увеличивала рост растений капусты в условиях дефицита воды и присутствия тяжелых металлов. Штамм *Pseudomonas* sp. KVS20, обладал способностью к азотфиксации, продукции ИУК, цианида водорода и сидерофоров, благодаря чему он заметно стимулировал рост растений горчицы [61]. Бактерии *Pseudomonas* sp. AF-54 образовывали ИУК, фиксировали азот и растворяли соединения фосфора, а также ингибировали рост и развитие *Fusarium oxysporum*, благодаря чему происходило

значительное увеличение роста, урожайности, содержания масла в семени и поглощения азота и фосфора из почвы инокулированными растениями подсолнечника [62]. Обработка растений кукурузы и пшеницы фосфатсолюбилизирующим, продуцирующим ИУК и сидерофоры штаммом *P. plecoglossicida* приводила к значительному увеличению параметров роста, урожайности и поглощения фосфора на фоне природного фосфорного удобрения по сравнению с контролем, где использовалось только это удобрение [63]. Бактерии *P. otitidis* SE8 и OL2 вырабатывали ИУК, гиббереллины и сидерофоры, солюбилизировали фосфор и калий. Обработка ими проростков томатов приводила к подавлению почвенных фитопатогенов, усилению поглощения азота, фосфора и калия, а также способствовала росту растений [64].

ПСЕВДОМОНАДЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ГРИБНЫМИ ФИТОПАТОГЕНАМИ

Серьезной проблемой растениеводства являются патогенные микроорганизмы и вредители, приводящие ежегодно к значительным потерям в мировом аграрном производстве [65, 66]. Длительное использование химических средств защиты растений приводит к выработке устойчивости у возбудителей, загрязнению и нарушению естественных экосистем и представляет угрозу для здоровья человека из-за высокого уровня токсичных соединений в сельскохозяйственной продукции [67, 68]. Анализ мирового опыта показывает возрастающую роль биологических средств защиты растений в комплексе природоохранных мероприятий, которые, в отличие от синтетических пестицидов, безвредны для окружающей среды и потребителя, малобюджетны и безотходны [69, 70]. Бактерии рода *Pseudomonas* являются типичными представителями почвенного биоценоза и способны быстро и успешно колонизировать ризосферу растения-хозяина. Они обладают целым рядом механизмов, определяющих их способность ингибировать развитие почвенных фитопатогенов и поэтому могут служить агентами биологического контроля, под которым понимают использование живых организмов для ограничения роста и развития фитопатогенных микроорганизмов [71, 72]. Это, в первую очередь, синтез антимикробных метаболитов различной структуры (феназины, цианид водорода, аммиак, биосурфактанты и др.) [73, 74]. Во-вторых, индукция защитных систем растений, которые запускаются благодаря образуемым бактериями веществам: салициловая и жасмоновая кислоты, сидерофоры, липополисахариды, летучие органические соединения (кетоны, пиразины и серосодержащие соединения) и др. [75–77]. Вызванная псевдомонадами системная устойчивость описана у целого ряда растений [78, 79]. В-третьих, конкуренция за питательные субстраты и поверхность корней [80, 81], эффективным орудием в которой являются бактериальные сидерофоры, уже упомянутые выше. В-четвертых, синтез литических ферментов (хитиназ, глюканаз, пептидаз), гидролизующих хитин, бета-глюканы и белки, вследствие чего происходит либо прямое подавление роста и развития патогена, либо высвобождение из его полимерных структур вторичных эндогенных индукторов устойчивости (олигосахаридов, хитозана), которые вызывают в растениях каскад защитных реакций: генерацию активных форм кислорода, синтез фитоалексинов, патогенно-зависимых белков, лигнификацию и т.д. [82]. К настоящему времени в литературе описано множество бактерий рода *Pseudomonas*, обладающих антагонизмом в отношении широкого круга фитопатогенных грибов и бактерий, при этом один штамм может использовать несколько механизмов воздействия на возбудителей заболеваний одновременно [83, 84].

Псевдомонады показали хорошие результаты при испытании против базидиомицета *Rhizoctonia solani*, поражающего преимущественно корни и прикорневую часть стебля различных культур [85, 86]. Штамм *Pseudomonas* sp. RU47 облегчал протекание болезни у растений картофеля и салата-латука в различных типах почв [87]. Сочетание обработки семян и почвы *P. fluorescens* PF-8 снижало заболеваемость ризоктониозом на 52.6% и повышало урожайность бамии на 30.8% за счет солюбилизации фосфатов, продукции сидерофоров, цианида водорода, ИУК, салициловой кислоты [88].

Выделены бактерии *Pseudomonas* spp., подавляющие рост и развитие аскомицета *Gaeumannomyces graminis* – причины офиоболезной корневой гнили злаков [89, 86]. В работе [90] показано, что штамм *P. chlororaphis* 30-84 ингибировал развитие этого микромицета за счет синтеза нескольких феназиновых антибиотиков. Изогенные производные *P. chlororaphis* 30-84, различающиеся только типом продуцируемых феназинов, обладали антигрибной активностью в отношении более широкого спектра фитопатогенов и более высокой степенью подавления вызываемых ими болезней.

Опрыскивание растений пшеницы, пораженных листовой гнилью (альтернариоз, возбудитель *Alternaria triticina),* штаммом *Pseudomonas* sp. приводило к более эффективному снижению интенсивности заболевания, увеличению длины и массы побега и корня, количества побегов и урожайности по сравнению с известными химическими фунгицидами [91]. Вне- и внутриклеточные метаболиты бактерий *P. putida* F19 и *P. aurantiaca* B-162 индуцируют системную устойчивость к альтернариозам у овощных культур разных семейств. При-

менение их смеси снижает заболеваемость проростков на 26.8–77.9% [92].

Ежегодно от 10 до 30% урожая риса теряется из-за поражения пирикуляриозным грибом *Pyricularia oryzae.* Помимо риса, патоген вирулентен для более, чем восьмидесяти видов культурных и дикорастущих растений. Для борьбы с ним из 200 штаммов *Pseudomonas* spp. – антагонистов *P. oryzae*, были отобраны 25, способные ингибировать рост мицелия на 25–98%. Два из них – *P. fluorescens* AI05 и *P. putida* AJ13 кроме подавления роста патогена и уменьшения тяжести симптомов пирикулярной инфекции (на 41%), обладали азотфиксирующей активностью, солюбилизировали неорганические фосфаты и продуцировали сидерофоры [93]. Установлено, что бактерии *P. chlororaphis* EA105 уменьшают проявление пирикуляриоза за счет индукции системной резистентности растений [82, 94].

Обнаружена высокая антагонистическая активность представителей вида *P. fluorescens* против возбудителей следующих заболеваний: шоколадной пятнистости бобов [95], корневых гнилей растений семейств злаковых [96] и имбирных [97]; ложной мучнистой росы и серой плесени виноградной лозы [98]; бурой монилиозной гнили плодов косточковых культур [99]. В ряде исследований одновременно применяли несколько штаммов *P. fluorescens* для достижения лучшего биоконтроля вредителей и фитопатогенов. По данным Агусти с соавт. [100] инокуляция растений клубники сразу двумя штаммами вида *P. fluorescens,* которые различались по продукции вторичных метаболитов, приводила к лучшему подавлению *Phytophthora cactorum* по сравнению с обработкой каждым штаммом по отдельности. В работе [101] изучены геномы 10 изолятов *P. fluorescens* и показано, что эти бактерии значительно различаются по своим защитным свойствам, что позволяет по-разному сочетать их для достижения более высокого результата. Комбинация трех штаммов *P. fluorescens* содействовала борьбе с микромицетом *Sarocladium oryzae,* вызывающим гниль риса, а также сокращению популяции корневой нематоды [102, 103].

Показано, что бактерии *P. putida* [104], *P. fluorescens* [105], *Pseudomonas* sp. [106] и *P. chlororaphis* [107] являются активными антагонистами оомицетов. Из 330 изолятов *Pseudomonas* spp., выделенных из различных источников, 118 проявляли антагонизм в отношении хотя бы одного из пяти видов этих микромицетов, вызывающих корневую гниль проростков сои, а 16 штаммов подавляли развитие всех патогенов, что свидетельствует об их перспективности как агентов биоконтроля [108].

Микроорганизмы *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* Vsk-26a3 высвобождают неорганические фосфаты и ингибируют рост 15 видов фитопатогенных грибов, в том числе двух штаммов *Microdochium nivale* при пониженных температурах (4–8°C), а также бактерий-возбудителей болезней человека, животных и растений (представителей родов *Erwinia, Xantomonas, Acinetobacter, Staphilococcus, Klebsiella* и пр.). При инокуляции ими повышается урожайность растений [109].

Возрастающие в последнее время распространение и вредоносность болезней, вызываемых грибами рода *Fusarium*, во всех странах, производящих зерно, требуют разработки более эффективных и безопасных средств борьбы с ними. Кроме потерь урожая, которые могут достигать 50% и ухудшения его качества, заболевание проявляется в загрязнении зерна токсинами, опасными для человека и животных. Современные химические фунгициды не обеспечивают полного подавления возбудителей, поскольку под их действием из биоценоза элиминируются и чувствительные к фунгицидам микромицеты-сапротрофы – конкуренты фитопатогенов. Поэтому биопрепараты на основе природных антагонистов, безвредные для растений, животных и человека, при своей специфичности позволят избежать многих нежелательных изменений в экосистемах, уменьшить загрязнение окружающей среды и снизить содержание фузариотоксинов в зерне [110, 111]. Так, бактерии *Pseudomonas* sp. WBC10 и *P. mediterranea* HU-9 продемонстрировали высокую эффективность в полевых опытах против фузариозов пшеницы [112, 113]. Растущий в широком диапазоне pH, психро- и галотолерантный штамм *P. chlororaphis* GBPI_507, продуцирует феназиновые антибиотики и проявляет антигрибные свойства в отношении *F. solani*, *F. oxysporum, Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp. и обладает такими важными характеристиками, как солюбилизация фосфатов и продукция сидерофоров, цианида водорода, аммиака и литических ферментов [114].

На основании анализа большого количества научных сообщений, начиная с 2000 г., показан положительный результат применения микроорганизмов, в том числе псевдомонад, в борьбе с заболеваниями огурца, банана и томата, вызываемыми штаммами *F. oxysporum* [115]. Установлена высокая биологическая эффективность микроорганизмов *P. chlororaphis* 14-3 против фузариоза сои (возбудитель *F. sporotrichioides*) и их ростостимулирующее влияние на длину и массу корней проростков этих растений [116]. Бубичи с соавт. [117] изучено значительное число публикаций, посвященных биологическому контролю над фузариозом бананов, вызванным *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, и сделан вывод о том, что, в целом, в полевых условиях лучшие результаты в борьбе с болезнью (до 79%) достигнуты при использовании штаммов рода *Pseudomonas* по сравнению с представителями родов *Trichoderma*, *Bacillus,* грибами арбускулярной микоризы и непатогенными штаммами рода *Fusarium* (42–70% эффективности).

Несмотря на то, что *P. aeruginosa* является условным патогеном, существует много исследований, доказывающих эффективность применения штаммов этого вида в борьбе с болезнями сельскохозяйственных растений. Так, бактерии *P. aeruginosa* 2apa продуцировали ИУК, сидерофоры и успешно колонизировали корни томата, а также способствовали росту растений и подавляли широкий спектр лиственных и корневых патогенов за счет синтеза феназиновых веществ и индукции системной резистентности [118]. Госвами с соавт. [119] сообщили о штамме *P. aeruginosa* BG, ингибирующем рост *F. oxysporum* и секретирующем ферменты (каталаза, уреаза и фосфатаза), ИУК, сидерофоры, аммиак и цианид водорода. Другие представители вида были также с успехом протестированы против указанного фитопатогена на различных культурах [120–122]. Штамм *P. aeruginosa* PA1201 подавлял рост сразу нескольких патогенных микромицетов и бактерий путем продукции феназиновых антибиотиков в количествах, которые, по мнению авторов, максимальны для выделенных в настоящее время изолятов этого вида [123]. Бактерии *P. aeruginosa* JO и JO7 значительно усиливали рост растений томата и успешно боролись с болезнями, вызываемыми *F. oxysporum* и *Alternaria solani* [124]. Три штамма *P. aeruginosa* обладали антагонизмом в отношении 5 видов грибов, являющихся причиной различных гнилей корневищ куркумы, что связано с образованием ими антибиотиков, цианида водорода и литических ферментов [125].

Микромицет *Verticillium dahliae* вызывает вертициллиозный вилт и раннее увядание многих растений. Штаммы *P. mandelii* PICF141, *P. aeruginosa* PIC25 и PIC105, продемонстрировали высокую ингибирующую активность в отношении этого фитопатогена [126]. Аналогичными свойствами обладают бактерии *P. mosselii* FS67 и *P. fluorescens* FS167, которые, кроме того, продуцируют ИУК, сидерофоры, протеазные и хитиназные ферменты, цианид водорода и растворяют фосфаты [72].

Изучены 2 штамма псевдомонад, подавляющих рост фитопатогенных грибов *R. solani, Gaeumannomyces graminis*, родов *Fusarium*, *Verticillium, Sclerotonia, Alternaria* и обладающих набором PGPB-свойств, таких как продукция антибиотиков феназинового ряда, цианида водорода, ауксинов, биосурфактантов, солюбилизация фосфатов. Инокуляция проростков огурца одним из них, *P. chlororaphis* Or3-3, в условиях инфекционного фона (*R. solani*) дает значительный прирост массы корней и надземной части растений. Другой микроорганизм – *P. fluorescens* O9-10, может быть использован для защиты растений от инфекций, вызываемых не только грибами, но и бактериями. Бактеризация семян штаммом O9-10 увеличивала длину корней проростков маша, ржи и пшеницы (10–54%), а урожай озимой пшеницы под его воздействием увеличился на 6.9% и превысил этот показатель, полученный при использовании коммерческого биопрепарата Псевдобактерин-2 (2.9%) [127, 128].

Штаммы псевдомонад проявляют значительные антигрибные свойства по отношению к микромицету *Sclerotium rolfsii*, повреждающему корни, прикорневую часть, основание стебля более 500 видов растений из разных семейств. Бактерия *P.* cf. *monteilii* 9 является активным антагонистом этого гриба (до 94% подавления) за счет продукции антибиотика, цианида водорода, сидерофоров и протеазы. Обработка ею семян арахиса привела к снижению заболеваемости на 45.5–66.7% [129]. Способность ингибировать рост и развитие *S. rolfsii* (на 60%) обнаружена также у *P. aeruginosa* KK11EBa-3 [130].

В результате скрининга штаммов рода *Pseudomonas*, подавляющих рост и развитие *Colletotrichum gloeosporioids* и *F. oxysporum*, из ризосферы кофе было выделено 40 изолятов, один из которых, *P. putida* PT11, показал максимальное ингибирование указанных патогенов (на 70–72%) и обладал способностью к продукции фитогормонов (ИУК и гиббереллинов), сидерофоров, литических ферментов и солюбилизации цинка. Обработка им семян кофе повышала всхожесть и снижала частоту заболеваний, вызванных этими фитопатогенами [78].

Аскомицет *Botrytis cinerea* является причиной серой гнили стебля, листьев, плодов и имеет более 200 видов сельскохозяйственных культур-хозяев. Обнаружен штамм *P. chlororaphis* Q16, подавляющий рост мицелия *B. cinerea* на 55–60% [131]. Бактерии *P. aeruginosa* LV повреждали гифы гриба [132], *Pseudomonas* sp. QBA5 – угнетали прорастание конидий и удлинение половых трубок гриба [133], *P. protegens* RhiNA – замедляли прорастание спор [134].

Выявлены штаммы псевдомонад-антагонистов следующих фитопатогенных микромицетов: *Phytophthora infestans,* являющегося причиной фитофтороза – самой тяжелой и широко распространенной болезни картофеля [107]; *Phaeomoniella chlamydospora* и *Phaeoacremonium aleophilum*, вызывающие трахеомикозы – болезни, разрушающие сосуды стволов растений, для которых до сих пор не найдено каких-либо эффективных методов контроля [135]; *Bipolaris sorokiniana* – возбудителя корневых гнилей злаковых культур [136].

Среди бактерий рода *Pseudomonas* достаточно часто встречаются антагонисты, эффективные против бактериальных поражений растений [123, 127, 128, 137]. Штамм *P. graminis* 49M подавляет *Erwinia amylovora*, вызывающую бактериальный ожог плодовых деревьев [138]. *P. brassicacearum* БИМ B-446 обладает аналогичным действием и, кроме того, ингибирует рост мицелия некоторых

фитопатогенных грибов [139]. Штамм *P. aeruginosa* LN, эффективно зарекомендовал себя против трех видов рода *Xanthomonas* – возбудителей листовых болезней растений. Благодаря его использованию количество поражений на листьях хлопка и апельсина уменьшилось на 94%, на листьях бобов – на 73% [140].

Еще одним подтверждением перспективности применения псевдомонад в качестве агентов биологической защиты растений стало выявление у некоторых бактерий (и их комбинаций) нематоцидной активности [141–143]. Известны штаммы, которые могут одновременно подавлять рост и развитие нематод и фитопатогенных грибов [144, 145] и, кроме того, проявлять инсектицидные свойства [146, 147].

Таким образом, в многочисленных опытах получено подтверждение того, что представители рода *Pseudomonas* могут применяться в экологически устойчивом агропроизводстве для снижения и предотвращения заболеваний сельскохозяйственных культур. Очевидно, что наиболее подходящими для практического использования следует считать штаммы с широким спектром антимикробной активности. Из приведенных примеров также видно, что многие псевдомонады-антагонисты могут оказывать стимулирующее воздействие на растения благодаря продукции регуляторов роста, улучшения доступности фосфора, т.е. проявлять свойства PGPB.

БИОПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ПСЕВДОМОНАД ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ

В настоящее время можно констатировать, что интенсификация растениеводства, основанного на использовании исключительно синтетических пестицидов и минеральных удобрений, достигла своих пределов. Появление органического сегмента в агропромышленном комплексе многих стран явилось реакцией на чрезмерную химизацию сельского хозяйства. По данным ежегодного отчета Международной федерации движений за органическое сельское хозяйство (IFOAM), в мире его практикуют 178 стран [148]. В 2018 г. к ним присоединилась и Российская Федерация.

Органическое земледелие подразумевает отказ от использования агрохимикатов в пользу альтернативных экологически безопасных систем землепользования, в том числе биотехнологических способов защиты и стимулирования роста растений, когда применяются препараты на основе микроорганизмов и их метаболитов [1, 2, 149]. По сравнению с химическими пестицидами они обладают рядом преимуществ:

– являются полифункциональными (эффективны в отношении широкого спектра фитопатогенов, способны стимулировать рост растений и улучшать их минеральное питание);

– экологически безопасны, так как бактерии, входящие в состав препаратов, являются естественными обитателями почвы и самих растений и не изменяют состав агробиоценозов;

– безвредны для человека, животных и растений;

– обладают пролонгированным действием, поскольку микроорганизмы, образующие активное начало биопрепаратов, способны заселять ризо- и филлосферу;

– не вызывают привыкание фитопатогенов;

– не имеют срока ожидания.

Кроме того, при использовании микробиологических препаратов происходит снижение химической нагрузки, как непосредственно на агроценоз, так и на прилегающие среды (почвы, грунтовые воды, водоприемники, воздушный бассейн и пр.), сокращение вносимых доз минеральных удобрений и пестицидов [150].

Из информации, представленной в предыдущих разделах, следует, что бактерии рода *Pseudomonas* обладают разнообразным набором свойств, позволяющих использовать их в качестве действующего вещества биопрепаратов аграрного назначения. Ниже даны примеры наиболее известных отечественных биопрепаратов для растениеводства, содержащих штаммы псевдомонад (табл. 1).

Белорусскими учеными разработаны и успешно внедрены в производство такие биопрепараты на основе псевдомонад, как биологический регулятор роста растений **Гулливер** (действующее вещество – штамм *P. aureofaciens* A8-6 и гуминовые кислоты), биопестициды **Аурин** (*P. aurantiaca* B-162/498), **Стимул** (*P. fluorescens* S-32), **Экогрин** (*P. brassicacearum* БИМ B-446) и препарат для подавления галловой нематоды **Немацид** (*P. putida* U) [153]. В табл. 2 приведен ряд зарубежных коммерческих биопрепаратов для борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур, действующим началом которых являются псевдомонады, из которой следует, что достаточно часто это штаммы *P. fluorescens*. В Индии биофунгициды на основе бактерий этого вида доступны под торговыми наименованиями ABTEC Pseudo, Biomonas, Esvin Pseudo, Sudo, Phalada 104PF, Sun Agro Monus и Biocure-B [154]. Известны биопестициды с антигрибной активностью Mycolytin, содержащий штамм *P. aurantiaca* M-518 [155] и Deny и Intercept, включающие *P. cepatia* [156].

Таблица 1. Российские биопрепараты для растениеводства на основе псевдомонад [151, 152]

Название	Действующее начало	Назначение	Действие	Обрабатываемая культура
Ризоплан	*P. fluorescens* AP-33	Биофунгицид	Подавляет развитие возбудителей гельминтоспориозной и фузариозной корневой гнили, различных видов пятнистости, бурой ржавчины, септориоза, мучнистой росы, церкоспороза, пероноспороза, ризоктониоза, плесневения семян, фитофтороза, черной ножки, парши и монилиоза	Зерновые, овощные, плодово-ягодные
Псевдобактерин-2	*P. aureofaciens* BS 1393	Биопестициды	Подавляет развитие возбудителей корневых гнилей различной этиологии, бурой ржавчины, бурой пятнистости, септориоза, мучнистой росы, церкоспороза, ризоктониоза, фитофтороза	Зерновые, овощные (в том числе культуры защищенного грунта)
Псевдобактерин-3	*P. aureofaciens* ВКМ В-2391Д			
Агат-25К	Метаболиты штамма *P. aureofaciens* H16 (ИУК, α-аланин и α-глутаминовая кислота)	Регулятор роста растений	Усиливает рост, устойчивость к болезням и неблагоприятным факторам среды, а также повышает урожайность	Овощные, зерновые, бобовые, ягодные, цветочно-декоративные, хвойные
Бинорам	Смесь трех штаммов *P. fluorescens* 7Г, 7Г2К, 17-2	Биопестицид	Подавляет развитие возбудителей гельминтоспориозных и фузариозных корневых гнилей, ризоктониоза, сосудистого и слизистого бактериозов	Зерновые, овощные
Елена	*P. aureofaciens* ИБ 51	Биопестицид	Подавляет развитие возбудителей фузариозной и гельминтоспориозной корневой гнили, плесневения семян	Зерновые
Гаупсин	Смесь двух штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*	Биопестицид, биоинсектицид	Обладает антигрибной, энтомопатогенной активностью и оказывает положительное влияние на урожайность и качество растениеводческой продукции	Овощные, зерновые, плодово-ягодные, цветочно-декоративные

БАКТЕРИИ РОДА *Pseudomonas* ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕКУЛЬТИВАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДАМИ ОБЪЕКТОВ

Интенсификация процессов разведки и добычи углеводородного сырья, обусловленная постоянно возрастающими потребностями в источниках энергии, неизбежно приводит к усилению контаминации окружающей среды, поэтому задача ликвидации последствий нефтяного загрязнения еще долго будет оставаться очень актуальной [162–164].

По сравнению с другими методами очистки нефтезагрязненных объектов, биотехнологический, базирующийся на использовании углеводородокисляющих микроорганизмов, признан

Таблица 2. Коммерческие биопрепараты иностранного производства на основе псевдомонад для защиты растений от болезней

Название биопрепарата	Действующее начало	Объект воздействия	Производитель	Источник
Conquer, Victum	*P. fluorescens*	*P. tolaasii*	Mauri Foods, Австралия	[156]
Dagger G	*P. fluorescens*	*Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp.	Ecogen, США	[157]
BlightBan A506	*P. fluorescens* A506	*Erwinia amylovora*	Nufarm Americas Inc., США	[158]
BioCoat	*P. fluorescens* WCS374r	*F. oxisporum*	S&G seeds, BV, Нидерланды	[156]
Proradix	*Pseudomonas* sp. DSMZ 13134	*Rhynchosporium secalis* *Gaeumannomyces graminis*	Sourcon Padena, GmbH & Co. KG, Германия	[159]
Серия Bio-Save	*P. syringae* ECS-100	*Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*	Eco Science Corp, США	[156]
Cedomon, Cerall	*P. chlororaphis* MA 342	*Fusarium* spp., *Pyrenophora teres*, *P. graminea*, *Tilletia caries*, *Septoria nodorum*	BioAgri AB, Швеция	[160]
AtEze	*P. chlororaphis* 63-28	*Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*	Turf Science Laboratories, США	[161]
Spot-Less	*P. aureofaciens* Tx-1	*Sclerotinia homeocarpa*, *Colletotrichum graminicola*, *Pythium aphanadermatum*, *Michrodochium nivale*	Turf Science Laboratories, США	[161]

наиболее экологически и экономически целесообразным [164, 165]. У бактерий рода *Pseudomonas* обнаружен ряд особенностей, позволяющих эффективно разрушать углеводороды и использовать их в качестве источника углерода и энергии, а именно: комплекс ферментов, окисляющих данные соединения (главным образом оксидаз); синтез поверхностно-активных веществ (**ПАВ**), увеличивающих биодоступность гидрофобных веществ, входящих в состав нефти; способность повышать уровень гидрофобности клеточной стенки при росте на углеводородах; дополнительный генетический материал в виде плазмид биодеградации, которые содержат гены, ответственные за деструкцию углеводородов и гетероциклических соединений [166–169]. Поэтому очевидно, что среди представителей этого рода обнаруживается значительное количество бактерий, которые можно применять для очистки почвы и воды от нефтяного загрязнения [170–172].

Выделены штаммы псевдомонад, подвергающие деградации различные нефтепродукты – бензин, керосин, дизельное топливо, моторное масло [173–175]. Штамм *P. panipatensis* C71 в водной среде при температуре 8°C разрушал 79.6% нефти и 40.0% дизельного топлива; при 20°C эти показатели составили 94.5 и 48.5%, при 30°C – 96.4 и 67.7% соответственно. При биорекультивации разлива арктического дизельного топлива за один вегетационный период (2 мес.) интродукция микроорганизмов в мерзлотную почву приводила к деструкции 91.7% нефтепродуктов. На основе иммобилизованной биомассы бактерий *P. panipatensis* C71 разработан биопрепарат для очистки почвы и воды от нефтяного загрязнения [176–178].

Несмотря на то, что вид *P. aeruginosa* является оппортунистическим патогеном человека, установлено, что некоторые его штаммы, выделенные из сред, загрязненных нефтью, способны разлагать широкий спектр алканов за счет наличия двух гомологичных *AlkB*-гидроксилаз, которые индуцируются в зависимости от длины углеводородной цепи [179, 180]. Кроме того, представители вида синтезируют биосурфактанты, чаще

всего рамнолипидной природы [180, 181]. Как показано Чебби с соавт. [183], штамм *P. aeruginosa* W10 разрушал 10, 20, 80, 90 и 99% гексадекана, пирена, флуорантена, фенантрена и сырой нефти соответственно. Продуцируемый им сурфактант показал значительную активность и высокую стабильность в широком диапазоне солености (до 150 г/л), температуры (до 100°C) и pH (2-12). Бактерии *P. aeruginosa* GOM1 подвергали деструкции 96% алифатической фракции (C_{12}–C_{38}) сырой нефти и образовывали биоПАВ [184]. Один из изолятов этого вида разлагал 58% дизельного топлива в почве [185], у другого обнаружена способность к очистке озерной воды от нефтепродуктов [186]. Обнаружены галотолерантные углеводородокисляющие бактерии *P. aeruginosa* [187, 188]. Так, в морской воде с помощью штамма Asph2 произошло разложение 58, 64, 56, 55 и 53% общего объема углеводородов, алканов, ароматических соединений, асфальтенов и смол соответственно [189].

Достаточно часто у псевдомонад наблюдается способность к деградации и очистке окружающей среды от полициклических ароматических углеводородов (**ПАУ**) [183, 190, 191], например, у представителей вида *P. stutzeri* [192, 193]. Благодаря использованию бактерий *P. putida* содержание нафталина в почве уменьшилось на 63.6%, а пирена – на 96.6% [194]. Степень биодеградации пирена штаммами *P. plecoglossicida* ATAI18 и *P. aeruginosa* ATAI19 составляла 45.3 и 31.2% соответственно [192]. Микроорганизмы *P. denitrificans* Fdl разлагали фенантрен за 14 сут на 83.2%, а в присутствии детергента – за 1 сут на 100% [195]. Два штамма *P. aeruginosa* RM1 и SK1 обладали значительной способностью к деструкции отработанного моторного масла в целом (на 63.4–90.8%), и содержащихся в нем ПАУ (антрацен, пирен, фитан и пристан), в частности [196]. Продуцирующая биоПАВ алкалофильная, металлотолерантная бактерия *P. aeruginosa* san ai разрушала н-алканы и такие ПАУ, как флуорен, фенантрен и пирен, с эффективностью 80–98, 96, 50 и 41% соответственно [197]. Показана способность штаммов псевдомонад к деструкции хризена, флуорантена [198, 199]. Микроорганизмы *P. veronii* и *P. gessardii* и разлагали нафталин, аценафтен, флуорен и фенантрен при 10 и 20°C. Кроме того, бактерии *P. veronii* были способны преобразовывать антрацен, флуорантен и пирен [198].

Проблема контаминации окружающей среды углеводородами очень актуальна для нашей страны, поэтому на сегодняшний день на основе псевдомонад или их ассоциаций с другими микроорганизмами разработано большое количество препаратов для очистки почвы и воды от нефтяного загрязнения. В качестве примеров можно привести Путидойл (*P. putida*) [200], Деворойл (*P. stutzeri*) [201], МикроБак (*Pseudomonas* sp., *P. putida*) [202], Биоионит (*P. putida*) [203], биопрепараты серии Нафтокс (*P. aeruginosa* или *P. citronellolis*) [204], серии Ленойл® (*P. turukhanskensis* или *P. koreensis*) [205–207] и серии Soilin (*P. azotoformans* KM-161 CA или *P. migulae* KP-24CO) [208, 209]. Однако качественный и количественный состав нефти и нефтепродуктов, а также почвенно-климатические условия очищаемых территорий неодинаковы, что объясняет необходимость продолжения исследований по созданию биопрепаратов-нефтедеструкторов.

Ведущим направлением современной экологической биотехнологии является поиск и применение полифункциональных микроорганизмов, обладающих кроме окислительной активности и другими важными характеристиками. Гидрофобность молекул углеводородов является основной причиной, затрудняющей их микробное разложение. Решить эту проблему способны биосурфактанты – различные поверхностно-активные вещества, синтезируемые микроорганизмами, механизм действия которых связан с процессами десорбции органических загрязнителей и переводом их в водную фазу, что увеличивает доступность для микроорганизмов, а также с гидрофобизацией клеточной поверхности бактерий для улучшения контакта с молекулами углеводородов [210]. Обнаружен изолят *Pseudomonas* sp. NEE2, эффективно разрушающий н-гексан за счет продукции биосурфактанта [172]. В состав биопрепарата “МикроБак” для очистки почв от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата входят бактерии *Pseudomonas* spp., образующие биоПАВ рамнолипидной природы [202]. Применение штамма *P. cepacia* CCT6659, продуцирующего гликолипидный биосурфактант, способствовало деградации моторного масла в почве за 10 сут на 83% и удалению нефтепродуктов из производственных сточных вод [211, 212].

Для восполнения недостатка азота, возникающего при попадании нефти в почву, обычно используют большое количество минеральных азотных удобрений, что является экономически невыгодным и экологически небезопасным [213]. Применение для этих целей азотфиксирующих бактерий-нефтедеструкторов представляется перспективным направлением биотехнологических исследований [214, 2015]. В работе [216] показано, что диазотрофный штамм *P. aeruginosa* активно утилизирует сырую нефть и усиливает ее деградацию в заболоченных почвах с низким содержанием азота. По мнению Соркхох с соавт. [217], для биоремедиации дефицитной по азоту нефтезагрязненной почвы можно использовать бактерии видов *P. putida*, *P. stutzeri, P. pseudoalcaligenes,* способные к деградации нефти, накоплению молекулярного азота и устойчивые к присутствию ртути в среде. Разработаны и внедрены в производство полифункциональные биопрепа-

раты-нефтедеструкторы “Ленойл”® – супер и “Ленойл”® – гранд (Россия, производитель ЗАО НПП “Биомедхим”, г. Уфа), в состав которых входит штамм *P. koreensis* ИБ-4, обладающий значительной нитрогеназной активностью [206, 218]. Применение этих препаратов позволяет уменьшить расходы на биорекультивацию за счет снижения дозы вносимых азотных удобрений.

Современным подходом к биоремедиации почв является использование штаммов-нефтедеструкторов, способных также к фитостимуляции путем продукции различных биологически активных веществ, улучшения фосфорного и азотного питания, повышения стрессоустойчивости и опосредованной стимуляции за счет антагонизма в отношении фитопатогенных агентов. Высокий биотехнологический потенциал имеют бактерии *P. putida* DB1, которые разрушали 65% сырой нефти, снижали фитотоксичность нефтезагрязненной почвы и увеличивали всхожесть семян, длину проростков и корней зернобобовой культуры *Vigna mungo* [219], а также штаммы *P. aeruginosa* AS03 и NA108, интродукция которых в контаминированную углеводородами почву привела к уменьшению содержания поллютанта на 40%, повышению активности почвенных ферментов и усилению роста чайных растений [220]. В работе [221] установлено, что штаммы *Pseudomonas* spp. VI4.1 и VI4T1, разлагающие дизельное топливо, нафталин, бензол, толуол, этилбензол, ксилол и синтезирующие сидерофоры, органические кислоты и фитогормоны могут быть использованы в составе микробно-растительных комплексов для биорекультивации. Инокуляции нефтезагрязненной почвы бактериями *P. aeruginosa* положительно сказывалась на длине корней и побегов растений люцерны, выращиваемой на ней, и способствовала снижению содержания углеводородов на 68%. Фиторемедиация с помощью люцерны приводила к уменьшению содержания поллютанта на 47%, а использование только бактерий – на 59% [222]. Обработка почвы, контаминированной нефтью, углеводородокисляющими и продуцирующими ауксины бактериями *P. plecoglossicida* 2,4-D, *P. extremaustralis* K2 или *P. hunanensis* C7, стимулировала рост и развитие растений ячменя и приводила к ускорению разложения поллютанта [223, 224]. Выделены и сконструированы новые плазмидосодержащие штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, совмещающие способность деградировать ПАУ, подавлять рост фитопатогенов и продуцировать ИУК, которые можно использовать для разработки нового поколения биопрепаратов для защиты и усиления роста растений, а также очистки почв от комплексного загрязнения нефтепродуктами, ПАУ и тяжелыми металлами [137]. Бактерия *P. aeruginosa* L10 эффективно разлагает н-алканы (C_{10}–C_{26}) и ПАУ (нафталин, фенантрен и пирен), продуцирует биосурфактант рамнолипидной природы и обладает стимулирующими рост растений свойствами, включая образование сидерофоров и ИУК [225].

Некоторые псевдомонады-нефтедеструкторы не теряют активности в широком диапазоне температур и переносят условия засоления. Так, для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов при низких положительных температурах предлагаются штаммы *P. panipatensis* C71 [175], *P. turukhanskensis* ИБ 1.1 [204], *P. libanensis* B-3041D [226] и *P. azotoformans* 1Y-2014 [227]. Обнаружены штамм *P. migulae* KP-24CO и галотолерантный изолят *P. zotoformans* KM-161 CA, которые эффективно окисляют углеводороды в интервале от 1 до 20°C и синтезируют биосурфактант группы липопептидов вискозин [207, 228]. Использование микроорганизмов *P. extremaustralis* ARC 38 и *P. deceptionensis* ARC 44 способствует удалению нефтяного загрязнения акваторий и береговой линии при –2.5–20°C и солености 20–40 г/л [229, 230]. Запатентован консорциум для очистки вод и седиментов Балтийского моря от нефти, в составе которого бактерии *P. abietaniphila* 30W, имеющие плазмиду деградации нафталина и растущие при 3–5% NaCl и температуре 6–30°C [231].

* * *

Повсеместное загрязнение окружающей среды, связанное с неэффективным использованием природных ресурсов (углеводородов, в частности) и создающее угрозу для жизни и здоровья людей, а также борьба с голодом и необходимость обеспечения продовольственной безопасности являются, в настоящее время, наиболее острыми проблемами мирового масштаба. Выходом может стать создание технологий и микробиологических продуктов, целенаправленно воздействующих на биосферу и ее компоненты. При их разработке необходимо руководствоваться современными тенденциями в биотехнологии, а именно, применением в качестве основы для биопрепаратов как экологического, так и сельскохозяйственного назначения полифункциональных штаммов микроорганизмов, обладающих комплексом полезных характеристик, позволяющих решать сразу несколько задач. Наиболее часто этим требованиям отвечают бактерии рода *Pseudomonas*, которые распространены повсеместно и характеризуются высокой технологичностью. Они проявляют свойства PGPB, продуцируют метаболиты, регулирующие рост и развитие растений, повышают доступность элементов минерального питания, индуцируют механизмы системной устойчивости к стрессам абиотической и биотической природы. Кроме того, эти микроорганизмы являются действенными агентами биологического контроля фитопатогенов путем синтеза антимикробных соединений различной структуры, запуска защитных систем растений, конкуренции за питательные субстраты и поверхность корней,

образования литических ферментов. Естественно, что наибольший интерес для растениеводства представляют штаммы, обладающие одновременно стимулирующим и защитным действием. Псевдомонады являются активными деструкторами углеводородов, в том числе ПАУ, благодаря наличию окислительных ферментных систем и образованию биосурфактантов. Они могут интенсивно размножаться и сохранять высокую численность в широком диапазоне температур, pH, концентрации поллютантов и в присутствии NaCl. Интродукция штаммов углеводородокисляющих псевдомонад-азотфиксаторов способна приводить к корректировке углеродно-азотного баланса, нарушенного в результате нефтяного загрязнения. Перспективным направлением является использование для биорекультивации почв бактерий, сочетающих деструктивные и фитостимулирующие свойства. Не смотря на то, что на основе псевдомонад уже разработано много биопрепаратов для растениеводства и очистки окружающей среды, поиск и изучение активных штаммов микроорганизмов рода *Pseudomonas* продолжает представлять значительный интерес для расширения возможности их применения, как в аграрной, так и природоохранной практике.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № АААА-А18-118022190100-9, а также при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-05025/20.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nawaz M., Mabubu J.I., Hua H.* // J. Entomol. Zool. Stud. 2016. V. 4. № 2. P. 241–246.
2. *Majeed A., Muhammad Z., Ahmad H.* // Plant Cell Rep. 2018a. V. 37. № 12. P. 1599–1609.
3. *Stokstad E.* // Science. 2016. V. 353. № 6305. P. 1225–1227.
4. *Jacoby R., Peukert M., Succurro A., Koprivova A., Kopriva S.* // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Art. 1617. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617
5. *Бакаева М.Д., Четвериков С.П., Коршунова Т.Ю., Логинов О.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 2. С. 204–212.
6. *Gouda S., Kerry R. G., Das G., Paramithiotis S., Shin H.-S., Patra J.K.* // Microbiol. Res. 2018. V. 206. P. 131–140.
7. *Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 1368. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368
8. *Singh M., Awasthi A., Soni S.K., Singh R., Verma R.K., Kalra A.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. 15500. https://doi.org/10.1038/srep15500
9. *Shameer S., Prasad T.* // Plant Growth Regul. 2018. V. 84. № 3. P. 603–615.
10. *Ma Y., Rajkumar M., Zhang C., Freitas H.* // J. Hazard. Mater. 2016. V. 320. P. 36–44.
11. *Rahman M., Sabir A.A., Mukta J.A., Khan M.M.A., Mohi-Ud-Din M., Miah M.G., Islam M.T.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 2504. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20235-1
12. *Hu J., Wei Z., Weidner S., Friman V.-P., Xu Y.-C., Shen Q.-R., Jousset A.* // Soil Biol. Biochem. 2017. V. 113. P. 122–129.
13. *Kim Y.C., Anderson A.J.* // Mol. Plant Pathol. 2018. V. 19. № 10. P. 2349–2359.
14. *Fang K., Bao Z.-S.-N., Chen L., Zhou J., Yang Z.-P., Dong X.-F., Zhang H.-B.* // PeerJ. Microbiology. 2019. V. 7. Art. e7099. https://doi.org/10.7717/peerj.7099
15. *Priyanka, Goudar G., Nath P.J.N., Patil P.V.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2017. V. 6. № 12. P. 3883–3898.
16. *Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu, Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu.* // Acta Physiol. Plant. 2017. V. 39. Art. 253. https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9
17. *Hassan T.U., Bano A.* // Geomicrobiol. J. 2019. V. 36. № 4. P. 376–384.
18. *Iqbal A., Hasnain S.* // Am. J. Plant Sci. 2013. V. 4. № 9. P. 1693–1700.
19. *Reetha S., Bhuvaneswari G., Thamizhiniyan P., Ravi Mycin T.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2014. V. 3. № 2. P. 568–574.
20. *Ali B.* // Turk. J. Bot. 2015. V. 39. https://doi.org/10.3906/bot-1401-31
21. *Raheem A., Shaposhnikov A., Belimov A.A., Dodd A.C., Ali B.* // Arch. Agron. Soil Sci. 2018. V. 64. № 4. P. 574–587.
22. *Flores O., Prince C., Nuñez M., Vallejos A., Mardones C., Yañez C., Besoain X., Bastías R.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1907. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01907
23. *McClerklin S.A., Lee S.G., Harper C.P., Nwumeh R., Jez J.M., Kunkel B.N.* // PLoS Pathog. 2018. V. 14. № 1. Art. e1006811. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006811
24. *Maheshwari D.K., Dheeman S., Agarwal M.* // Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. / Ed. D.K. Maheshwari. Springer Int., 2015. P. 159–182.
25. *Kapoor R., Kaur M.* // Afr. J. Microbiol. Res. 2016. V. 10. № 32. P. 1274–1279.
26. *Karnwal A., Kaushik P.* // Arch. Phytopathol. Plant Protec. 2011. V. 44. № 17. P. 1728–1735.
27. *Großkinsky D.K., Tafner R., Moreno M.V., Stenglein S.A., García de Salamone I.E., et al.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. Art. 23310. https://doi.org/10.1038/srep23310
28. *Sharma S., Sharma A., Kaur M.* // J. Pharmacogn. Phytochem. 2018. V. 7. № 1. P. 2790–2795.
29. *Kapoor R., Soni R., Kaur M.* // Int. J. Agricul. Environ. Biotechnol. 2016. V. 9. № 2. P. 193–199.
30. *Kang S.M., Radhakrishnan R., Khan A.L., Kim M.J., Park J.M., Kim B.R., Shin D.H., Lee I.J.* // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 84. P. 115–124.
31. *Феклистова И.Н., Маслак Д.В., Гринева И.А., Садовская Л.Е., Скакун Т.Л., Максимова Н.П.* // Тру-

ды Белорусского гос. ун-та. 2015. Т. 10. № 1. С. 90–97.

32. *Pandya N.D., Desai P.V.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2014. V. 3. № 5. P. 110–115.
33. *Ямборко Н.А., Леонова Н.О., Иутинская Г.А.* // Мікробіологія і біотехнологія. 2016. № 4. С. 96–107.
34. *Patel T., Saraf M.* // J. Plant Interact. 2017. V. 12. № 1. P. 480–487.
35. *Salomon M.V., Bottini R., de Souza Filho G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M.* // Physiol. Plant. 2014. V. 151. № 4. P. 359–374.
36. *Yao L.X., Wu Z.S., Zheng Y.Y., Kaleem I., Li C.* // Eur. J. Soil Biol. 2010. V. 46. № 1. P. 49–54.
37. *Sharma T., Kumar N., Rai N.* // Int. J. Pharm. Bio. Sci. 2016. V. 7. № 1. P. 306–314.
38. *Trapet P., Avoscan L., Klinguer A., Pateyron S., Citerne S., Chervin C. et al.* // Plant Physiol. 2016. V. 171. № 1. P. 675–693.
39. *Schiessl K.T., Janssen E.M.-L., Kraemer S.M., McNeill K., Ackermann M.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1964. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01964
40. *Sasirekha B., Srividya S.* // Agric. Nat. Resour. 2016. V. 50. № 4. P. 250–256.
41. *Li H.-B., Singh R.K., Singh P., Song Q.-Q., Xing Y.-X., Yang L.-T., Li Y.-R.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1268. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01268
42. *Hassen W., Neifar M., Cherif H., Najjari A., Chouchane H., Driouich R.C., et al.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 34. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00034
43. *Fox A.R., Soto G., Valverde C., Russo D., Lagares A.J., Zorreguieta Á. et al.* // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. № 10. P. 3522–3534.
44. *Pham V.T., Rediers H., Ghequire M.G., Nguyen H.H., De Mot R., Vanderleyden J., Spaepen S.* // Arch. Microbiol. 2017. V. 199. № 3. P. 513–517.
45. *Ke X., Feng S., Wang J., Lu W., Zhang W., Chen M., Lin M.* // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 42. № 2. P. 248–260.
46. *Шабаев В.П.* // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 3. С. 268–281.
47. *Maroniche G.A., Rubio E.J., Consiglio A., Perticari A.* // J. Gen. Appl. Microbiol. 2016. V. 62. № 5. P. 248–257.
48. *Hajjam Y., Cherkaoui S.* // J. Material. Environ. Sci. 2017. V. 8. № 3. P. 801–808.
49. *Kalayu G.* // Int. J. Agronomy. 2019. V. 2019. Article ID 4917256. https://doi.org/10.1155/2019/4917256
50. *Arkhipova T.N., Galimsyanova N.F., Kuzmina L.Yu., Vysotskaya L.B., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A., Kudoyarova G.* // Plant Soil Environ. 2019. V. 65. № 6. P. 313–319.
51. *Santoro M.V., Cappellari L.R., Giordano W., Banchio E.* // Plant Biol. 2015. V. 17. № 6. P. 1218–1226.
52. *Sandhya V., Ali S.Z., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B.* // Plant Growth Regul. 2010. V. 62. № 1. P. 21–30.
53. *Mishra S.K., Kha M.H., Misra S., Dixit K.V., Khare P., Srivastava S., Chauhan P.S.* // Antonie Van Leeuwenhoek. 2017. V. 110. № 2. P. 253–270.
54. *Chu T.N., Tran B.T.H., Van Bui L., Hoang M.T.T.* // BMC Res Notes. 2019. V. 12. № 1. Artt. 11. https://doi.org/10.1186/s13104-019-4046-1
55. *Khan N., Bano A., Babar M.A.* // Symbiosis. 2017. V. 72. № 3. P. 195–205.
56. *Kadmiri I.M., Chaouqui L., Azaroual S.E., Sijilmassi B., Yaakoubi K., Wahby I.* // Arab. J. Sci. Eng. 2018. V. 43. № 7. P. 3403–3415.
57. *Saleem M., Asghar H.N., Zahir Z.A., Shahid M.* // Chemosphere. 2018. V. 195. P. 606–614.
58. *Kong Z., Deng Z., Glick B.R., Wei G., Chou M.* // Ann. Microbiol. 2017. V. 67. P. 49–58.
59. *Chatterjee P., Samaddar S., Anandham R., Kang Y., Kim K., Selvakumar G., Sa T.* // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Art. 705. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00705
60. *Ma Y., Látr A., Rocha I., Freitas H., Vosátka M., Oliveira R.S.* // Agronomy. 2019. V. 9. № 1. Art. 33. https://doi.org/10.3390/agronomy9010033
61. *Vishwakarma K., Kumar V., Tripathi D.K., Sharma S.* // Environ. Sustain. 2018. V. 1. № 3. P. 253–265.
62. *Majeed A., Kaleem A.M., Hameed S., Yasmin S., Hanif M.K., Naqqash T., Imran A* // Microbiol. Res. 2018b. V. 216. P. 56–69.
63. *Kaur G., Reddy M.S.* // J. Arch. Agronom. Soil Sci. 2014. V. 60. № 4. P. 549–564.
64. *Saber M.A.F., Abdelhafez A.A., Hassan E.A., Ramadan E.M.* // Ann. Agric. Sci. 2015. V. 60. № 1. P. 131–140.
65. *Zhang H., Mahunu G.K., Castoria R., Apaliya M.T., Yang Q.* // Trends Food Sci. Technol. 2017. V. 69. P. 36–45.
66. *Syed Ab Rahman S.F., Singh E., Pieterse C.M.J., Schenk P.M* // Plant Sci. 2018. V. 267. P. 102–111.
67. *Figueroa M., Hammond-Kosack K.E., Solomon P.S.* // Mol. Plant Pathol. 2018. V. 19. № 6. P. 1523–1536.
68. *Schiro G., Müller T., Verch G., Sommerfeld T., Mauch T., Koch M., Grimm V., Müller M.E.H.* // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 126. № 1. P. 177–190.
69. *Carmona-Hernandez S., Reyes-Pérez J.J., Chiquito-Contreras R.G., Rincon-Enriquez G., Cerdan-Cabrera C.R., Hernandez-Montiel L.G.* // Agronomy. 2019. V. 9. Art. 121. https://doi.org/10.3390/agronomy9030121
70. *Cuthbert R.N., Dick J.T., Callaghan A., Dickey J.W.* // Biol. Control. 2018. V. 121. P. 50–57.
71. *Müller T., Behrendt U., Ruppel S., von der Waydbrink G., Müller M.E.H.* // Curr. Microbiol. 2016. V. 72. № 4. P. 383–389.
72. *Safdarpour F., Khodakaramian G.* // Biol. J. Microorg. 2019. V. 7. № 28. P. 77–90.
73. *Chen J., Wu O., Hua Y., Chen J., Zhang H., Wang H.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. P. 8309–8319.
74. *Monnier N., Furlan A., Botcazon C., Dahi A., Mongelard G., Cordelier S. et al.* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Art. 1170. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01170

75. *Raza W., Liu N.L.D., Wei Z., Huang Q., Shen Q.* // Microbiol. Res. 2016. V. 192. P. 103–113.
76. *Rojas-Solís D., Zetter-Salmón E., Contreras-Pérez M., Rocha-Granados M.C., Macías-Rodríguez L., Santoyo G.* // Biocat. Agricul. Biotechnol. 2018. V. 13. P. 46–52.
77. *Guevara-Avendano E., Bejarano-Bolivar A.A., Kiel-Martinez A.L., Ramirez-Vazquez M., Mendez-Bravo A., von Wobeser E.A. et al.* // Microbiol. Res. 2019. V. 219. P. 74–83.
78. *Kejela T., Thakkar V.R., Patel R.R.* // Rhizosphere. 2017. V. 4. P. 9–15.
79. *Fatima S., Anjum T.* // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Art. 848. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00848
80. *Dinesh R., Anandaraj M., Kumar A., Bini Y.K., Subila K.P., Aravind R.* // Microbiol. Res. 2015. V. 173. P. 34–43.
81. *Jain A., Das S.* // Int. J. Agronomy. 2016. V. 2016. Art. 4269010. https://doi.org/10.1155/2016/4269010
82. *Spence C.A., Raman V., Donofrio N.M., Bais H.P* // Planta. 2014. V. 239. № 1. P. 171–185.
83. *Sun D., Zhuo T., Hu X., Fan X., Zou H.* // Biol. Control. 2017. V. 114. P. 45–50.
84. *Patkowska E.* // Plant Soil Environ. 2018. V. 64. № 3. P. 120–125.
85. *Akter S., Kadir J., Juraimi A.S., Saud H.M., Elmahdi S.* // J. Environ. Biol. 2014. V. 35. № 6. P. 1095–1100.
86. *Yang M.M., Wen S.S., Mavrodi D.V., Mavrodi O.V., von Wettstein D., Thomashow L.S., Guo J.H., Weller D.M.* // Phytopathology. 2014. V. 104. № 3. P. 248–256.
87. *Schreiter S., Babin D., Smalla K., Grosch R.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 97. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00097
88. *Adhikari A., Dutta S., Nandi S., Bhattacharya I., De Roy M., Sarkar G., Mandal T.* // Afr. J. Agric. Res. 2013. V. 8. № 4. P. 405–412.
89. *Lagzian A., Saberi Riseh R., Khodaygan P., E. Sedaghati, Dashti H.* // Arch. Phytopathol. Plant Protect. 2013. V. 46. № 17. P. 2104–2116.
90. *Yu J.M., Wang D., Pierson L.S., III, Pierson E.A.* // Plant Pathol. J. 2018 V. 34. № 1. P. 44–58.
91. *Pandey G.K., Singh R.K., Simon S.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2018. V. 7. № 2. P. 3466–3476.
92. *Феклистова И.Н., Кулешова Ю.М., Федорович М.Н.* // Вестник БГУ. Сер. 2. Химия. Биология. География. 2013. № 2. С. 38–42.
93. *Hernandez-Rodriguez A., Acebo-Guerrero Y., Fernandez G.P., Diaz de la Osa A., Restrepo-Franco G.M.* // Afr. J. Biotechnol. 2018. V. 17. № 38. P. 1196–1206.
94. *Spence C.A., Lakshmanan V., Donofrio N., Bais H.P.* // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. Art. 1082. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01082
95. *Alemu F., Alemu T.* // Afr. J.Microbiol. Res. 2013. V. 7. № 47. P. 5364–5373.
96. *Mavrodi D.V., Parejko J.A., Mavrodi O.V., Kwak Y.-S., Weller D.M., Blankenfeldt W., Thomashow L.S.* // Environ Microbiol. 2013. V. 15. P. 675–686.
97. *Prabhukarthikeyan S.R., Keerthana U., Raguchander T.* // Microbiol. Res. 2018. V. 210. P. 65–73.
98. *Lakkis S., Trotel-Aziz P., Rabenoelina F., Schwarzenberg A., Nguema-Ona E., Clément C., Aziz A.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 1112. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01112
99. *Zhang Q., Ji Y., Xia, Q., Chng S., Tong Y., Chen X., Liu F.* 6 // Microbiol. Res. 2016. V. 188. P. 106–112.
100. *Agusti L., Bonaterra A., Moragrega C., Camps J., Montesinos E.* // J. Plant Pathol. 2011. V. 93. № 2. P. 363–372.
101. *Loper J.E., Hassan K.A., Mavrodi D.V., Davis E.W., Lim C.K., Shaffer B.T.* // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 7. Art. e1002784. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784
102. *Saravanakumar D., Lavanya N., Muthumeena K., Raguchander T., Samiyappan R.* // Biocontrol. 2009. V. 54. P. 273–286.
103. *Seenivasan N., David P.M.M., Vivekanandan P., Samiyappan R.* // Biocontrol Sci. Technol. 2012. V. 22. № 6. P. 611–632.
104. *Shi J., Liu A., Li X., Chen W.* // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93. № 3. P. 568–574.
105. *Redondo-Nieto M., Barret M., Morrissey J., Germaine K., Martinez-Granero F., Barahona E. et al.* // BMC Genomics. 2013. V. 14. Art. 54. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-54
106. *Van Der Voort M., Meijer H. J., Schmidt Y., Watrous J., Dekkers E., Mendes R., Dorrestein P.C., Gross H., Raaijmakers J.M.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 693. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00693
107. *Guyer A., De Vrieze M., Bönisch D., Gloor R., Musa T., Bodenhausen N., Bailly A., Weisskopf L.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1309. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01309
108. *Wagner A., Norris S., Chatterjee P., Morris P.F., Wildschutte H.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1007. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01007
109. Патент РФ. 2016. № 2603281.
110. *Жиглецова С.К., Старшов А.А., Клыкова М.В., Кондрашенко Т.Н., Антошина О.А., Дунайцев И.А., Коломбет Л.В.* // Агрохимия. 2015. № 7. С. 49–57.
111. *Müller T., Ruppel S., Behrendt U., Lentzsch P., Müller M.E.H.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2124. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02124
112. *Kumar P., Thakur S., Dhingra G.K., Singh A., Pal M.K., Harshvardhan K., Dubey R.C., Maheshwari D.K.* // Biocat. Agricul. Biotechnol. 2018. V. 15. P. 264–269.
113. *Ullah H., Yasmin H., Mumtaz S., Jabeen Z., Naz R., Nosheen A., Hassan M.N.* // Phytopathology. 2020. V. 110. № 3. https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-19-0383-R
114. *Jain R., Pandey A.* // Microbiol. Res. 2016. V. 190. P. 63–71.
115. *Raza W., Ling N., Zhang R., Huang Q., Xu Y., Shen Q.* // Critical Rev. Biotechnol. 2017. V. 37. № 2. P. 202–212.
116. *Курилова Д.А.* LAP LAMBERT Acad. Publ., 2017. 124 с.
117. *Bubici G., Kaushal M., Prigigallo M.I., Gómez-Lama Cabanás C., Mercado-Blanco J.* // Front. Microbiol.

2019. V. 10. Art. 616.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616

118. *Hariprasad P., Chandrashekar S., Singh S.B., Niranjana S.R.* // J. Basic Microbiol. 2014. V. 54. № 8. P. 792–801.
119. *Goswami D., Patel K., Parmar S., Vaghela H., Muley N., Dhandhukia P., Thakker A.N.* // Plant Growth Regul. 2015. V. 75. № 1. P. 253–263.
120. *Yasmin S., Hafeeza F.Y., Rasul G.* // Biocontrol. Sci. Technol. 2014. V. 24. № 11. P. 1227–1242.
121. *Sekhar A.C., Thomas P.* // Am. J. Plant Sci. 2015. V. 6. № 7. P. 943–954.
122. *Islam M.A., Nain Z., Alam M.K., Banu N.A., Islam M.R.* // Egyp. J. Biol. Pest. Contr. 2018. V. 28. Art. 90.
https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1
123. *Zhou L., Jiang H.X., Sun S., Yang D.D., Jin K.M., Zhang W., He Y.W.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 32. Art. 50.
https://doi.org/10.1007/s11274-015-1987-y
124. *Paramanandham P., Rajkumari J., Pattnaik S., Busi S.* // Int. J. Veg. Sci. 2017. V. 23. № 4. P. 294–303.
125. *Chenniappan C., Narayanasamy M., Daniel, G.M., Ramaraj G.B., Ponnusamy P., Sekar J., Ramalingam P.V.* // Biol. Control. 2019. V. 129. P. 55–64.
126. *Gómez-Lama Cabanás C., Legarda G., Ruano-Rosa D., Pizarro-Tobías P.,* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 277.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00277
127. Патент РФ. 2016. № 2588473.
128. Патент РФ. 2018. № 2646160.
129. *Rakh R.R., Raut L.S., Dalvi S.M., Manwar A.V.* // Rec. Res. Sci. Tech. 2011. V. 3. № 3. P. 26–34.
130. *Chanutsa N., Phonkerd N., Bunyatratchata W.* // J. Advanc. Agricul. Technol. 2014. V. 1. № 2. P. 132–135.
131. *Zdravković J., Ugrinović M., Zdravković M., Đorđević S., Pavlović S., Jošić D.* // Pestic. Phytomed. 2015. V. 30. № 3. P. 169–178.
132. *Simionato A.S., Navarro M.O.P., de Jesus M.L.A., Barazetti A.R., da Silva C.S., Simões G.C. et al.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1102.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102
133. *Gao P., Qin J., Li D., Zhou S.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 1. Art. e0190932.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190932
134. *Abdelwahab R., Leila B., Nacera T., Yousra B., Fatma N., Cruz C., Nabti E.A.* // Int. J. Sci. Res. Sci. Technol. 2016. V. 2. № 6. P. 227–237.
135. *Andreolli M., Zapparoli G., Angelini E., Lucchetta G., Lampis S., Vallini G.* // Microbiol. Res. 2019. V. 219. P. 123–131.
136. *Минаева О.М., Акимова Е.Е., Терещенко Н.Н., Зубанова Т.И., Апенышева М.В., Кравец А.В.* // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 5. С. 366–375.
137. *Сиунова Т.В., Анохина Т.О., Сизова О.И., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Кочетков В.В., Боронин А.М., Patil S.G., Chaudhari A.B.* // Биотехнология. 2017. № 2. С. 56–67.
138. *Mikiciński A., Sobiczewski P., Puławska J., Malusa E.* // Arch. Microbiol. 2016. V. 198. № 6. P. 531–539.
139. *Мандрик-Литвинкович М.Н., Носонова Т.Л., Купцов В.Н., Молчан О.В., Гриц А.Н., Янчевская Т.В., Коломиец Э.И.* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Сборник науч. трудов. Минск: Белорусская наука, 2015. Т. 7. С. 184–197.
140. *Spago F.R., Ishii Mauro C.S., Oliveira A.G., Beranger J.P.O., Cely M.V.T., Stanganelli M.M., et al.* // Crop Prot. 2014. V. 62. № 1. P. 46–54.
141. *Canchignia H., Altimira F., Montes C., Sánchez E., Tapia E., Miccono M., et al.* // J. Gen. Appl. Microbiol. 2017. V. 63. № 1. P. 11–21.
142. *Wei J.Z., Siehl D.L., Hou Z., Rosen B., Oral J., Taylor C.G., Wu G.* // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 19. Art. e00942-17.
https://doi.org/10.1128/AEM.00942-17
143. *Nam H.S., Anderson A.J., Kim Y.C.* // Plant Pathol. J. 2018. V. 34. № 3. P. 241–249.
144. *Nandi M., Berry C., Brassinga A.K.C., Belmonte M.F., Fernando W.G.D., Loewen P.C., de Kievit T.R.* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. № 23. P. 6889–6898.
145. *Kang B.R., Anderson A.J., Kim Y.C.* // Plant Pathol. J. 2018. V. 34. № 1. P. 35–43.
146. *Bensidhoum L., Nabti E., Tabli N., Kupferschmied P., Weiss A., Rothballer M., Schmid M., Keel C., Hartmann A.* // Eur. J. Soil Biology. 2016. V. 75. P. 38–46.
147. *Rangel L.I., Henkels M.D., Shaffer B.T., Walker F.L., Davis E.W., II, Stockwell V.O., et al.* // PLoS One. 2016. V. 11. Art. Ke0161120.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161120
148. IFOAM. Annual Report 2017. https://www.ifoam.bio/leading-change/organically-annual-report-2017
149. *Bhattacharjee R., Dey U.* // Afr. J. Microbiol. Res. 2014. V. 8. № 17. P. 1749–1762.
150. *Itelima J.U., Bang W.J., Onyimba I.A., Egbere O.J.* // Microbiol. Biotechnol. Rep. 2018. V. 2. № 1. C. 22–28.
151. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов", разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2019, 2020. Ч. I. Пестициды. https://mcx.gov.ru
152. *Kiprianova E.A., Safronova L.A., Prosyanov A.O.* // Biotechnol. Acta. 2017. V. 10. № 1. P. 7–16.
153. *Феклистова И.Н., Садовская Л.Е., Маслак Д.В., Гринева И.А., Кулешова Ю.М., Скакун Т.Л., Ломоносова В.А., Лысак В.В., Максимова Н.П.* // Биологически активные препараты для растениеводства. Научное обоснование – рекомендации – практические результаты. Материалы XIV межд. науч.-практ. конф. Минск: БГУ, 2018. С. 196–198.
154. *Khan U., Khan M.R.* // Ann. Plant Protect. Sci. 2015. V. 23. № 2. P. 302–307.
155. *Shahid I., Mali, K.A., Mehnaz S.* // Environ. Sustain. 2018. V. 1. P. 3–17.
156. *Meena B.* Basic and Applied Aspects of Biopesticides // Ed. K. Sahayaraj: Springer, 2014. P. 17–30.
157. *Sharma P.D.* ECOLOGY AND ENVIRONMENT (BC-4). Rastogi Publications, 2013. 468 p.
158. *Stockwell V.O., Johnson K.B., Sugar D., Loper J.E.* // Phytopathology. 2010. V. 100. № 12. P. 1330–1339.
159. *Fröhlich A., Buddrus-Schiemann K., Durner J., Hartmann A., von Rad U.* // J. Plant Interac. 2012. V. 7. № 1.
https://doi.org/10.1080/17429145.2011.597002

160. *O'Callaghan M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 5729–5746.
161. *Arrebola E., Tienda S., Vida C., de Vicente A., Cazorla F.M.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 719. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00719
162. *Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Elkin A.A., Makarov S.O., Cunningham C.J. et al.* // Environ. Sci: Processes & Impacts. 2015. V. 17. № 7. P. 1201–1219.
163. *Wu M., Ye X., Chen K., Li W., Yuan J., Jiang X.* // Environ. Pollut. 2017. V. 223. P. 657–664.
164. *Yu Y., Zhang Y., Zhao N., Guo J., Xu W., Ma M., Li X.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020. V. 17. Art. 1471. https://doi.org/10.3390/ijerph17051471
165. *Mapelli F., Scoma A., Michoud G., Aulenta F., Boon N., Borin S., Kalogerakis N., Daffonchio D.* // Trends Biotechnol. 2017. V. 35. P. 860–870.
166. *Sharma S., Pathak H.* // Int. J. Pure App. Biosci. 2014. V. 2. № 1. P. 213–222.
167. *Kahlon R.S. Pseudomonas*: Molecular and Applied Biology. / Ed. R.S. Kahlon. Switzerland: Springer, 2016. P. 343–417.
168. *Pandey P., Pathak H., Dave S.* // Res. J. Environ. Toxicol. 2016. V. 10. № 1. P. 1–15.
169. *Koshlaf E., Ball A.S.* // AIMS Microbiol. 2017. V. 3, № 1. P. 25–49.
170. *Safdari M., Kariminia H., Ghobadi Nejad Z., Fletcher T.H.* // Water Air Soil Pollut. 2017. V. 228. Article 37. https://doi.org/10.1007/s11270-016-3220-5
171. *Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Gao X., Li F., Li H., Yu H.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2885. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885
172. *He S., Ni Y., Lu L., Chai Q., Liu H., Yang C.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 16615. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52661-0
173. Патент РФ. 2016. № 2575063.
174. *Kumar V., Singh S., Manhas A., Singh J., Singla S., Kaur P. et al.* // Orient. J. Chem. 2014. V. 30. № 4. P. 1771–1776.
175. *Vignesh R., Arularasan A., Gandhiraj V., Charu Deepika R.* // Int. Res. J. Engin. Technol. 2016. V. 3. № 4. P. 2503–2508.
176. Патент РФ. 2013. № 2484130.
177. Патент РФ. 2014. № 2525932.
178. Патент РФ. 2016. № 2600872.
179. *Liu H., Xu J., Liang R., Liu J.* // PLoS One. 2014. V. 9. Art. e105506. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105506
180. *Thomas J.C., Wafula D., Chauhan A., Green S.J., Gragg R., Jagoe C.* // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 149. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00149
181. *Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., Pinheirode Souza Oliveira R* // Int. Biodeter. Biodegrad. 2014. V. 89. P. 88–94.
182. *Kezrane I., Harouna B.M., Hamadache M., Benkortbi O., Amrane A.* // Environ. Monit. Assess. 2020. V. 192. Art. 287. https://doi.org/10.1007/s10661-020-08269-3
183. *Chebbi A., Hentati D., Zaghden H., Baccar N., Rezgui F., Chalbi M., Sayadi S., Chamkha M.* // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2017. V. 122. P. 128–140.
184. *Muriel-Millán L.F., Rodríguez-Mejía J.L., Godoy-Lozano E.E., Rivera-Gómez N., Gutierrez-Rios R.-M., Morales-Guzmán D. et al.* // Front. Mar. Sci. 2019. V. 6. Art. 572. https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00572
185. *You Z., Xu H., Zhang S., Kim H., Chiang P.-C., Yun W., Zhang L., He M.* // Appl. Sci. 2018. V. 8. Art. 2551. https://doi.org/10.3390/app8122551
186. *Kiraye M., John W., Gabriel K.* // J. Bioremed. Biodegrad. 2016. V. 7. № 2. P. 335–339.
187. *Pasumarthi R., Chandrasekaran S., Mutnuri S.* // Mar. Poll. Bull. 2013. V. 15. № 76. P. 276–282.
188. *Varjani S.J., Upasani V.N.* // Bioresour. Technol. 2016. V. 222. P. 195–201.
189. *Ali H.R., Ismail D.A., El-Gendy N.S.* // Energy Sources. Part A. 2014. V. 36. № 13. P. 1429–1436.
190. *Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y.* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1369. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369
191. *Mukherjee A.K., Bhagowati P., Biswa B.B., Chanda A., Kalita B.* // J. Proteomics. 2017. V. 167. P. 25–35.
192. *Amini I., Tahmourespour A., Abdollahi A.* // Pollution. 2017. V. 3. P. 9–19.
193. *Singh P., Tiwary B.* // Biocat. Agricul. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 20–29.
194. *Pizarro-Tobías P., Fernández M., Niqui J.L., Solano J., Duque E., Ramos J.-L., Roca A.* // Microb. Biotechnol. 2015. V. 8. № 1. P. 77–92.
195. Патент РФ. 2016. № 2575064.
196. *Salam L.B.* // 3 Biotech. 2016. V. 6. № 1. Art. 98. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0419-5
197. *Medić A., Lješević M., Inui H., Beškoski V., Kojić I., Stojanović K., Karadžić I.* // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 14060–14070.
198. *Wald J., Hroudova M., Jansa J., Vrchotova B., Macek T., Uhlik O.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1268. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01268
199. *Nwinyi O.C., Ajayi O.O., Amund O.O.* // Braz. J. Microbiol. 2016. V. 47. № 3. P. 551–562.
200. А.С. № 1076446. Б.И. 1984.
201. Патент РФ. 1994. № 2023686.
202. Патент РФ. 2007. № 2378060.
203. Патент РФ. 2015. № 2571219.
204. *Рогозина Е.А., Тимергазина И.Ф., Моргунов П.А.* // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2014. Т. 9. № 2. http://www.ngtp.ru/rub/7/19_2014.pdf
205. Патент РФ. 2015. № 2539148.
206. *Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Логинов О.Н.* // Экология и промышленность России. 2018. № 9. С. 18–22.
207. *Korshunova T.Y., Ramírez-Bahena M.-H., Chetverikov S.P., Igual J.M., Peix A., Loginov O.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. № 11. P. 4657–4664.
208. Патент РФ. 2015. № 2571180.
209. Патент РФ. 2016. № 2604788.

210. *Mao X., Jiang R., Xiao W., Yu J.J.* // Hazard. Mater. 2015. V. 285. P. 419–435.

211. *Silva E.J., Rocha e Silva N.M.P., Rufino R.D., Luna J.M., Silva, R.O., Sarubbo L.A.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2014. V. 117. P. 36–41.

212. *Silva E.J., Almeida D.G., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A.* // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. V. 41. P. 1599–1610.

213. *Sutton M.A., Howard C., Erisman J.W., Billen G., Bleeker A., Grenfelt P., van Grinsven H., Grizzetti B.* Cambridge University Press, 2011. 612 p.

214. *Mazumdar A., Deka M.* // Int. J. Bio-Technol. Res. 2013. V. 3. № 4. P. 69–76.

215. *Pérez-Vargas J., Vigueras-Carmona S.E., Zamudio-Moreno E., Rivera Casado N.A., Calva Calva G.* // Rev. Int. Contam. Ambie. 2017. V. 33. P. 105–114.

216. *John R.C., Itah A.Y., Essien J.P., Ikpe D.I* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2011. V. 87. № 3. P. 343–353.

217. *Sorkhoh N.A., Ali N., Dashti N., Al-Mailem D.M., Al-Awadhi H., Eliyas M., Radwan S.S.* // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2010. V. 64. № 3. P. 226–231.

218. *Рафикова Г.Ф., Коршунова Т.Ю., Миннебаев Л.Ф., Четвериков С.П., Логинов О.Н.* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 317–326.

219. *Vinothini C., Sudhakar S., Ravikumar R.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015. V. 4. № 1. P. 318–329.

220. *Roy A.S., Yenn R., Singh A.K., Boruah H.P.D., Saikia N., Deka M.* // Afric. J. Biotechnol. 2013. V. 12. № 19. P. 2600–2610.

221. *Imperato V., Portillo-Estrada M., McAmmond B.M., Douwen Y., Van Hamme J.D., Gawronski S.W., Vangronsveld J., Thijs S.* // Genes. 2019. V. 10. Art. 443. https://doi.org/10.3390/genes10060443

222. *Agnello A.C., Bagar, M., Van Hullebusch E.D., Esposito G., Huguenot D.* // Sci. Total Environ. 2016. V. 563–564. P. 693–703.

223. *Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Высоцкая Л.Б., Архипова Т.Н., Ахтямова З.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н.* // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 1. С. 144–150.

224. *Bakaeva M., Kuzina E., Vysotskaya L., Kudoyarova G., Arkhipova T., Rafikova G. et al.* // Plants. 2020. V. 9. Art. 379. https://doi.org/10.3390/plants9030379

225. *Wu T., Xu J., Xie W., Yao Z., Yang H., Sun C., Li X.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1087. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01087

226. Патент РФ. 2017. № 2619183.

227. Патент РФ. 2019. № 2692629.

228. Патент РФ. 2015. № 2553338.

229. Патент РФ. 2019а. № 2694610.

230. Патент РФ. 2019б. № 2694612.

231. Патент РФ. 2019. № 2688725.

The Role of *Pseudomonas* Bacteria in Sustainable Development of Agrosystems and Protection of the Environment (Review)

T. Yu. Korshunova[a, *], M. D. Bakaeva[a], E. V. Kuzina[a], G. F. Rafikova[a], S. P. Chetverikov[a], D. V. Chetverikova[a], and O. N. Loginov[a]

[a] *Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

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

The use of specialized cultures of microorganisms and biological products based on them seems to be the most acceptable way to solve such pressing problems as increasing yields and protecting plants from diseases, as well as eliminating the consequences of pollution with oil and oil products. The current trend in the development of agricultural and environmental biotechnology is the use of microorganisms with a set of useful properties. These include representatives of the genus *Pseudomonas*, many of which are capable of stimulating the growth and development of plants, suppressing phytopathogenic organisms, destruction of hydrocarbons of various structures, activity in a wide range of temperatures, production of biosurfactants, etc. This literature review shows that the search and study active strains of pseudomonads is of considerable interest from the point of view of the possibility of their widespread use, both in agricultural and recultivation practice.

Keywords: bacteria of the genus *Pseudomonas*, PGPB, biological control agents, oil degradation, nitrogen fixation, biosurfactants, biological products

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 228–234

УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМОЗИНА БЕЛУХИ (*Delphinapterus leucas*) В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Komagataella phaffii* И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА

© 2021 г. С. Ю. Филькин[1], Н. В. Чертова[1], С. С. Зацепин[1], Э. Г. Садыхов[1], А. Н. Фёдоров[1], А. В. Липкин[1, *]

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

**e-mail: lipus57@yahoo.com*

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.
После доработки 17.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Получен штамм-продуцент *Komagataella phaffii* рекомбинантного химозина белухи *Delphinapterus leucas* с продуктивностью 80 мг/л, изучены физико-химические свойства фермента для возможного применения в пищевой промышленности. Удельная активность рекомбинантного химозина белухи была значительно ниже по сравнению с химозином быка и составляла 55 IMCU/мг. Химозин белухи обладал высокой неспецифической протеолитической активностью, что ухудшалое его свойства, и делало невозможным его использование в пищевой промышленности. Можно предположить, что аминокислотные замены K221M и K294Q критически важны и приводят к ослаблению связывания мицелл казеина с рекомбинантным химозином белухи.

Ключевые слова: *Pichia pastoris*, метилотрофные дрожжи, химозин, белуха

DOI: 10.31857/S0555109921030028

Химозин различных жвачных животных в настоящее время активно используется в пищевом производстве. Химозин быка является аспартатной эндопептидазой и одним из наиболее изученных и востребованных ферментов в современной биохимии, широко используемый в сыроварении [1]. Более 70% используемого химозина в мировой пищевой промышленности – это рекомбинантный химозин. С большинством известных ферментов ученые ведут постоянную работу по созданию суперпродуцентов и получению мутантов с улучшенными свойствами. Поиск более активных и стабильных форм химозина из других видов животных для нужд пищевой промышленности раннее привел к открытию и использованию новых форм рекомбинантного химозина [2, 3]. Прежде всего, это относится к изучению химозина верблюда, который обладал большей термостабильностью и специфичностью: наилучшим соотношением молокосвертывающей активности (**МСА**) к протеолитической (**ПА**), МСА/ПА. Стоит отметить, что химозин яка также обладает высокой стабильностью в более широком диапазоне pH. Список химозинов других видов, охарактеризованных ранее, включает: химозин овцы, буйвола, яка, одногорбого и двугорбого верблюдов, а также альпака и марала [2, 4–8]. Однако, химозин белухи ранее не был охарактеризован. На первый взгляд, эволюционная разница между жвачными животными и китообразными велика, но химозин белухи обладает высокой гомологией с химозином быка по первичной последовательности.

Белуха (*Delphinapterus leucas)* это морское млекопитающее семейства нарваловых, значительная часть популяции которого живет в арктических условиях. Молоко морских млекопитающих одно из наиболее жирных по составу, поэтому молодые детеныши набирают вес быстро [9]. Кроме того, первичная последовательность казеина белухи близка к казеину быка [10]. Экстремальные условия существования этого животного позволили предположить, что его химозины могут иметь изменения в структуре, связанные с адаптацией к арктическим условиям.

В качестве экспрессирующей системы для продукции химозина белухи были выбраны метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). Экспрессирующая система *K. phaffii* широко используется для создания рекомбинантных белков в пищевой индустрии и показывает свою состоятельность при создании рекомбинантных штаммов-продуцентов химозина быка, буйвола, верблюда и яка, что подтверждает удобство использования данной платформы [6, 11–13]. Кроме того,

использование штамма-продуцента *K. phaffii* позволяет проверить ранее разработанный метод выделения рекомбинантного фермента на химозине белухи *D. leucas*.

Цель работы – получение рекомбинантного химозина белухи *Delphinapterus leucas*, экспрессированного в метилотрофных дрожжах *K. phaffii*, и исследование его физико-химических свойств для возможного применения в пищевой индустрии.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали: ДНК-полимеразу (Pfu, "Stratagene Inc.", США), эндонуклеазы рестрикции, Т4 ДНК-лигазу ("New England Biolabs", США), зеоцин ("Thermo Fisher Scientific", США). Олигонуклеотиды синтезированы в "Евроген" (Россия). Наборы для выделения и экстракции ДНК "Qiagen GmbH" (Германия). Использовались сорбенты DEAE-сефароза и фенил-сефароза ("GE Healthcare", Швеция).

Штаммы микроорганизмов и вектора. Штамм *Komagataella phaffii* GS115 his4[mut+] и вектор pPICzα получены от "Invitrogen" (США). Для клонирования использовали штамм *E. coli* Xl10 Gold endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB $lacI^qZ\Delta M15$ Tn10(Tet^R Amy Cm^R)] ("Stratagene", США). Компоненты сред производства "Acros Organics" (США).

Приготовление сред. Среды были приготовлены по протоколу [12]. Чашки Петри для селекции трансформантов заливали твердой средой YPD, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1, пептон – 2, глюкоза – 2, агар-агар – 2. Для селекции трансформантов использовали среду YPD с концентрацией зеоцина 100 и 200 мкг/мл. Среду BMGY, имеющую следующий состав (%): дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 2.0; дрожжевых азотистых оснований без аминокислот – 1.34; глицерин – 1.0; биотин – 4×10^{-5}; 100 мМ фосфат калия, pH 6.0; использовали для культивирования трансформантов. Для индукции экспрессии среду BMGY заменяли средой BMMY, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 2.0; дрожжевые азотистые основания без аминокислот – 1.34; глицерин – 1.0, метанол – 1.0, биотин – 4×10^{-5}, 100 мМ фосфат калия, pH 6.0.

Синтез гена и конструкция вектора. Кодон-оптимизированный вариант гена прохимозина белухи *D. leucas* (A0A2Y9P896) для *K. phaffii* был синтезирован "Twist Bioscience" (США). Для конструирования экспрессирующего вектора ген прохимозина ChymBe был рестрицирован по сайтам XhoI/NotI и лигирован в вектор pPICZαA по сайтам XhoI/NotI.

Трансформация *K. phaffii* и селекция трансформантов. Трансформацию метилотрофных дрожжей *K. phaffii* осуществляли методом электропорации. Электрокомпетентные клетки были приготовлены согласно протоколу: 10 мкг плазмиды pPICzα_ChymBe линеаризовали эндонуклазой рестрикции SacI и трансформировали в компетентные клетки GS-115 *K. phaffii*. Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с твердой средой, содержащей 1.0% дрожжевого экстракта, 2% пептон, 2% глюкозы и 1 М сорбитол с концентрацией зеоцина 200 мкг/мл в соответствии с протоколом производителя.

Отобранные Mut^+-трансформанты, устойчивые к зеоцину, анализировали на наличие вставки гена ChymBe при помощи ПЦР с олигонуклеотидными праймерами AOX1F 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' и AOX1R 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'.

Первичные культуры отобранных клонов выращивали в 50 мл пробирках в среде BMGY 12–16 ч при 30°C до достижения значения $ОП_{600}$ 3.0–4.0. Выросшие клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 3000 g и температуре 25°C. Клетки разбавляли средой BMMY до достижения $ОП_{600}$ 1.0. Экспрессию индуцировали 1%-ным метанолом. Каждые 24 ч добавляли 1%-ный раствор метанола для поддержания его постоянной концентрации. Время культивирования составляло 84 ч. Культуральную жидкость осаждали [14] ТХУ и анализировали присутствие химозина в 10%-ном ПААГ с ДНС по методу Лэммли [15].

Продукция рекомбинантного химозина белухи в ферментере. Отобранный клон культивировали в 150 мл среды BMGY до достижения $ОП_{600}$ 10 при 30°C. Затем инокулят переносили в ферментер "Biostat B+" ("Sartorius", Германия) с 0.5 л минеральной среды BSM, следующего состава (г/л): глицерин – 70, KH_2PO_4 – 9.4, минеральная подпитка PTM1 – 4.86 мл, $(NH_4)_2SO_4$, – 15.7, $MgSO_4$ – 4.6, $CaCl_2$– 0.35, биотин – 4 мг. Для защиты от пенообразования использовали пеногаситель "Софексил" в концентрации 0.5 г/л ("Софэкс-Силикон", Россия). Значение pH поддерживали на уровне 4.0 при помощи титрования 10%-ными растворами серной кислоты и гидроксида аммония. После достижения максимального уровня плотности клеток проводили индукцию метанолом. В первые 48 ч добавляли 1% метанола и 2% сорбитола, затем добавляли только 1% метанола. При индукции температуру среды снижали до 26°C, а pH поднимали до уровня 5.5. Потребление метанола оценивали по уровню кислорода в культуральной жидкости, время культивирования составляло 84 ч с момента индукции метанолом.

Выделение и очистка рекомбинантного химозина. Культуральную жидкость, содержащую химозин, отделяли от клеток центрифугированием 3000 g 10 мин при 25°C. Супернатант фильтровали через (0.45 мкм) фильтр ("Millipore", США),

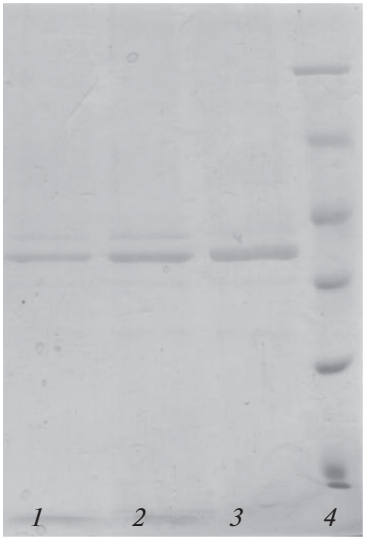


Рис. 1. Электрофореграмма белков химозина белухи, образуемых в биореакторе в ходе ферментации pPICzα-ChymBe за 24 (*1*), 48 (*2*), 72 (*3*) ч от начала индукции метанолом, (*4*) маркеры молекулярной массы 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 10 кДа.

инкубировали с DEAE-сефарозой, предварительно уравновешенной 50 мМ Na_2HPO_4, pH 5.5. Связавшийся белок элюировали тем же буфером, содержащим 0.3 М NaCl. Фракции, содержащие химозин, объединяли, добавляли хлорид натрия до 3.0 М концентрации. Объединенные фракции наносили на колонку, объемом 10 мл с фенил-сефарозой, предварительно уравновешенную 50 мМ Na_2HPO_4 с 3 М NaCl, pH 5.5. Элюцию проводили градиентом концентрации хлорида натрия (от 3.0 → 0.0 М). Фракции, содержащие химозин, собирали, количество белка ($ОП_{280}$) измеряли в каждой фракции спектрофотометрическим методом. Чистоту полученного белка подтверждали электрофорезом в ПААГ с ДНС.

Определение активности химозина. Молокосвертывающую активность определяли согласно [11]. Сухое обезжиренное молоко восстанавливали в объеме 100 мл, добавляли 50 мМ $CaCl_2$, инкубировали при 37°C 30 мин. К 1 мл молока при 37°C добавляли 25 мкл раствора химозина. Время образования сгустка определяли в соответствии с соответствующим временем свертывания контрольного образца химозина (600 IMCU/мл). Все измерения проводили независимо в трех повторах.

Протеолитическую активность определяли согласно [7] с незначительными изменениями. В качестве субстрата использовали раствор 1%-ного казеина быка (“Biotech”, США) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 5.5. Образцы химозина разбавляли раствором субстрата в соотношении 1 : 4 и инкубировали при 35°C в течение 0, 30, 60, 90 и 180 мин. Реакцию останавливали добавлением ТХУ. Специфичность фермента определяли, как отношение молокосвертывающей активности к протеолитической, принимая отношение активностей химозина быка за 1.0.

Гомологичное моделирование структуры химозина и филогенетический анализ. Построение модели рекомбинантного химозина белухи осуществлялось при помощи программы “Modeller 9v12”. Кристаллографическая структура химозина быка 4AA8 [16] использовалась в качестве шаблона. Для филогенетического анализа использовали программу “Clystal Omega”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Селекция трансформантов *K. phaffii*. Ген прохимозина белухи был синтезирован “Twist Bioscience”, США. Аминокислотная последовательность гена взята из Uniprot (A0A2Y9P896). Плазмида pPICzα содержала ген прохимзина белухи ChymBe под контролем AOX1 промотора. Для секреции рекомбинантного прохимозина использовался альфа-фактор из *Saccharomyces cerevisae* [17].

Электрокомпетентные клетки GS115 использовались для трансформации, селекцию трансформантов проводили на твердой среде YPD при концентрации зеоцина 100 мкг/мл. Для дальнейшего скрининга было отобрано 30 трансформантов, которые выращивались в 50 мл среды BMGY в 250 мл колбах. После 84 ч индукции, культуральную жидкость проверяли на наличие химозина и молокосвертывающую активность. Прохимозин был предварительно активирован понижением pH, как описано в методике. Активность химозина белухи составляла 3 IMCU/мл при концентрации белка 50 мг/л, что значительно меньше, чем для химозина быка, экспрессированного при тех же условиях. Клон трансформанта с максимальной активностью и наиболее высокой концентрации белка использовался для продукции прохимозина белухи в реакторе. Идентичность прохимозина белухи была подтверждали методом MALDI-масс-спектрометрии.

Культивирование химозина белухи в ферментере. Экспрессию прохимозина белухи в ферментере осуществляли, как описано в [12]. Выращивание дрожжей проводили в 0.5 л минеральной среды в течении 22 ч, при этом $ОП_{600}$ достигало значения 290. Экспрессию фермента индуцировали раствором 1%-ного метанола и 2%-ного сорбитола в течении 48 ч. На втором этапе индукции добавляли только 1%-ный раствор метанола, при этом концентрация белка достигала значения 80 мг/л при массе сухих клеток 120 г/л (рис. 1). Молокосвертывающая активность составляла 5 IMCU/мл, что значительно ниже соответствующих значений, достигнутых при выращивании продуцента химозина быка [12].

Выделение и очистка химозина белухи. Активацию, выделение и очистку химозина проводилась как описано в [12]. Выделение химозина осуществляли в несколько этапов: активация с понижением pH, нейтрализация, анионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий. Раствор активированного химозина разбавляли в соотношении 1 : 3 об./об. 50 мМ натрий-фосфатным буфером pH 5.5. При двухстадийной очистке химозина последовательно использовали хроматографию на DEAE-сефарозе и фенил-сефарозе. Результаты всех стадий очистки представлены в табл. 1.

Ферментативные свойства химозина белухи. Очищенные рекомбинантные химозины из *B. taurus* и *D. leucas* обладали молокосвертывающей активностью – 220 и 55 IMCU/мг соответственно. Специфическая молокосвертывающая активность рекомбинантного химозина белухи была значительно ниже, при этом протеолитическая активность химозина белухи была выше по сравнению с соответствующей активностью химозина быка. Соотношение молокосвертывающей активности к протеолитической MCA/PA для химозина быка 1.0, при этом расчетное значение для белухи было ниже 0.2. Сравнение результатов с полученными ранее для других видов, показало, что такие химозины как химозин верблюда [16] и альпака [7] являются более специфичными по отношению к субстрату.

pH-оптимум химозина белухи был определен как 6.0 (рис. 2а), что немного выше оптимального значения для химозина быка (5.5–5.8). Значение температурного оптимума для рекомбинантного химозина белухи 35°C не отличалось от химозина быка (рис. 2б). Активность химозина белухи была максимальной при более низкой концентрации кальция по сравнению с химозином быка (рис. 2в), что может быть связано с морской средой обитания белухи.

Сравнение аминокислотных последовательностей химозина быка и белухи выявило несколько замен (рис. 3, 4). Как было ранее показано в статье [16] аминокислотные замены K221M и K294Q являются критически важными для проявления активности и, возможно, вели к ухудшению связывания казеиновых мицелл с химо-

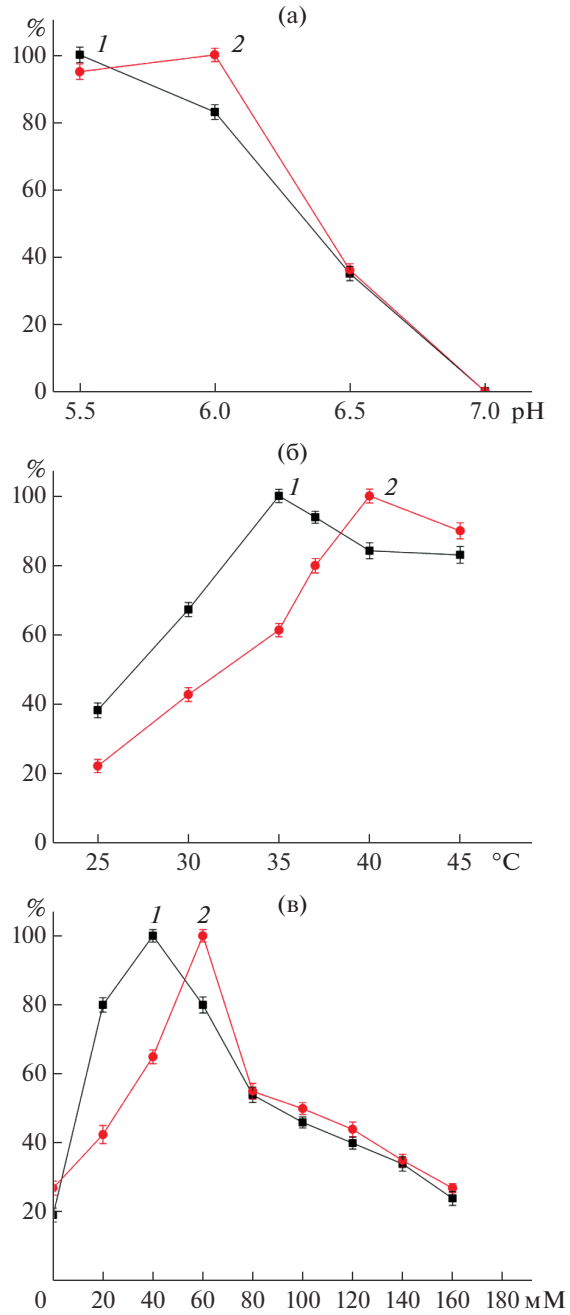


Рис. 2. Влияние pH (а), температуры (б) и хлорида кальция (в) на относительную молоко-свертывающую активность: *1* – химозин быка rChym *Bos taurus*, *2* – rChymBe химозин белухи *D. leucas*.

Таблица 1. Стадии выделения и очистки химозина

Стадия очистки	Общее количество химозина, мг	Активность химозина, IMCU/мл	Специфическая активность, IMCU/мг	Выход химозина по белку, %	Чистота препарата по белку, %
Супернатант	42.0	5.0	5.0	100	30
Анион-обменная хроматография	30.2	66 ± 10	37	71	60
Хроматография гидрофобных взаимодействий	25.2	230 ± 12	55	60	85–90

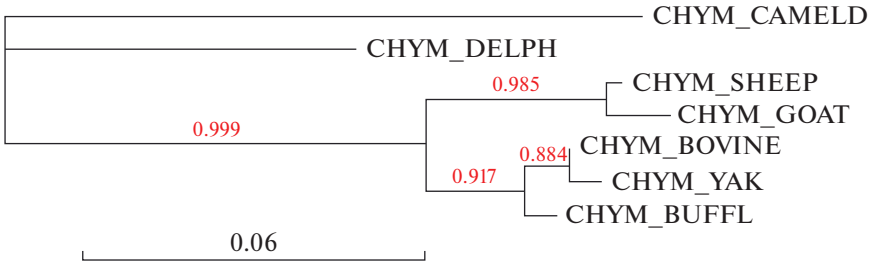


Рис. 3. Филогенетическое дерево химозинов различных видов: CHYM_CAMELD *Camelus dromedarius*, CHYM_DELPH *Delphinapterus leucas,* CHYM_SHEEP *Ovis aries*, CHYM_GOAT *Capra aegagrus*, CHYM_BOVINE *Bos taurus*, CHYM_YAK *Bos grunniens*, CHYM_BUFFL *Bubalus bubalis.* Масштаб соответствует с филогенетической дистанцией.

```
                                                 ▼
CHYM_CAMDR   GKVAREPLTSYLDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCKSNVCKNHHRFDP 60
CHYM_DLEUC   GEVASEPLTSYLDSQYFGKIYIGTPSQEFTVVFDTGSSDLWVPSVYCKSDACQNHHRFDP 60
CHYM_BOVIN   GEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDP 60
CHYM_SHEEP   GEVASVPLTNYLDSQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDP 60
             *:**  ***.***********:*** *****:*******:****:****:.*:**:****
                                                                ▼   ▼
CHYM_CAMDR   RKSSTFRNLGKPLSIHYGTGSMEGFLGYDTVTVSNIVDPNQTVGLSTEQPGEVFTYSEFD 120
CHYM_DLEUC   SMSSTFQNMGKPLSIQYGTGSMQGFLGYDTVTVSNIVDHQQTVGLSTQEPGDVFTYSEFD 120
CHYM_BOVIN   RKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFD 120
CHYM_SHEEP   RKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGILGYDTVTVSNIVDIQQTVGLSTQEPGDVFTYAEFD 120
               ****:*:******:******:*:************* :*******::**:****:***

CHYM_CAMDR   GILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSL 180
CHYM_DLEUC   GILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYLDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSL 180
CHYM_BOVIN   GILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSL 180
CHYM_SHEEP   GILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVAQDLFSVYMDRSGQGSMLTLGAIDPSYYTGSL 180
             ****:**********:*******:*:***:******:**.** ****************
                                                   ▼ ▼          ▼
CHYM_CAMDR   HWVPVTLQQYWQFTVDSVTINGVAVACVGGCQAILDTGTSVLFGPSSDILKIQMAIGATE 240
CHYM_DLEUC   HWIPVTLQKYWQFTLDSVTIGGVVVACDGGCQAILDTGTSMLVGPSSDILNIQMAIGATQ 240
CHYM_BOVIN   HWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVVACEGGCQAILDTGTSKLVGPSSDILNIQQAIGATQ 240
CHYM_SHEEP   HWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDTGTSKLVGPSSDILNIQQAIGATQ 240
             **:***:*:*****:*****.*..*** ************ *.*******:** *****:
              ▼                                                  ▼
CHYM_CAMDR   NRYGEFDVNCGNLRSMPTVVFEINGRDYPLSPSAYTSKDQGFCTSGFQGDNNSELWILGD 300
CHYM_DLEUC   NRYGEFDIDCGSLSSMPTVVFEINSRMYPLTPSAYTNQDQGFCTSGFQGENNSQQWILGD 300
CHYM_BOVIN   NQYGEFDIDCDNLSYMPTVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSENHSQKWILGD 300
CHYM_SHEEP   NQYGEFDIDCDSLSSMPTVVFEINGKMYPLTPYAYTSQEEGFCTSGFQGENHSHQWILGD 300
             *:*****::*..*  *********.: ***:* ***.:::********.:*:*. *****
                          ▼
CHYM_CAMDR   VFIREYYSVFDRANNRVGLAKAI    323
CHYM_DLEUC   VFIREYYSVFDRANNRVGLAKAV    323
CHYM_BOVIN   VFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI    323
CHYM_SHEEP   VFIREYYSVFDRANNLVGLAKAI    323
             *************** ******:
```

Рис. 4. Выравнивание белковых последовательностей химозинов различных видов: CHYM_CAMELD *Camelus dromedarius*, CHYM_DELPH *Delphinapterus leucas,* CHYM_SHEEP *Ovis aries.* Жирным шрифтом выделены значимые аминокислотные замены в химозине белухи, по сравнению с химозинами быка, овцы, верблюда.

зином (рис. 5). В дополнение к этому, рекомбинантный химозин белухи обладал более высокой неспецифической активностью, что ограничивало возможность его использования в пищевой промышленности. Вероятно, снижение специфической активности к казеиновым мицеллам связано с уменьшением общего поверхностного заряда рекомбинантного химозина белухи (+13) по сравнению с поверхностным зарядом химозина быка (+15) [16], а также положительно заряженным химозином верблюда (общий заряд +22). Другое возможное объяснение низкой активности рекомбинантного химозина белухи связано с субстратной специфичностью, так как в аминокислотных по-

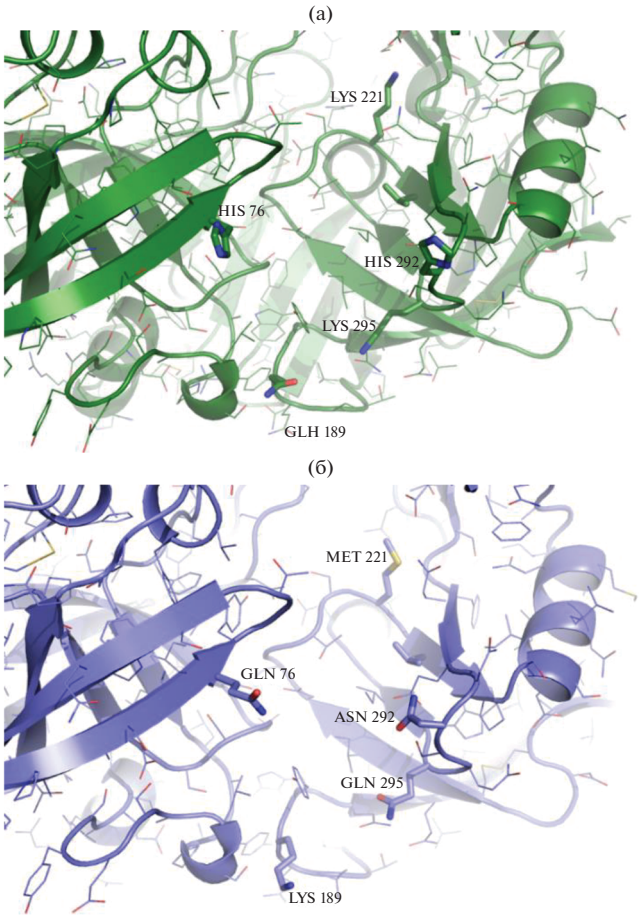


Рис. 5. Модель трехмерные структуры сайтов связывания химозина быка (а), 4AA8 [16] и белухи (б). Указаны позиции значимых аминокислотных замен в сайте связывания казеина.

следовательностях казеинов белухи и быка имеются одиночные отличия, такие как L103P и M106L [10].

В результате работы был получен штамм-продуцент с продуктивностью 80 мг/л. Однако специфическая активность рекомбинантного химозина белухи оказалась значительно ниже химозина быка и составила 55 IMCU/мг. Возможными причинами снижения удельной активности химозина белухи по сравнению с химозином быка являются аминокислотные замены K221M и K294Q, снижающие связывание отрицательно заряженной казеиновой мицеллы с химозином. При этом протеолитическая активность химозина белухи выше, что делает его непригодным для использования в пищевой промышленности.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 26.11.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V.K.* // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. V. 30. № 4. P. 243–258.
2. *Kappeler, S.R., van den Brink, H.(J.) M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E.B., Johansen, E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 2. № 342. P. 647–654.
3. *Беленькая С.В., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 315–326.
4. *Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., Villa, T.G.* // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 2. P. 609–613.
5. *Ersöz F., İnan M.* // Protein Expr. Purif. 2019. V. 154. P. 126–133.
6. *Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G.* // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 22. P. 10606–10610.
7. *Беленькая С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Ельчанинов В.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593.
8. *Belen'kaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A., Elchaninov V.V., Bakulina A. Yu., Rukhlova E.A., Lavrik O.I., Ilyichev A.A., Shcherbakov D.N.* // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 7. P. 916–928.
9. *Oftedal O.T.* //Encyclopedia of Dairy Sciences. /Ed. J. Fuquay, P.F. Fox and P. McSweeney, San Diego, CA.: Academic Press, 2011. V. 3. P. 563–580.
10. *Manguy J., Shields D.C.* // R. Soc. Open Sci. 2019. V. 6. № 10. P 1–17.
11. *Noseda D.G., Recupero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno. M.A.* // Protein Expr. Purif. 2016. V. 123. P. 112–121.
12. *Филькин С.Ю., Чертова Н.В. Вавилова Е.А., Зацепин С.С., Эльдаров М.А., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н., Липкин А.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. №. 6. С. 571–576.
13. *Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D.* // Protein Expr. Purif. 2015. V. 111. P. 75–81.
14. *Sagar A.J., Pandit M.W.* // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 743. № 3. P. 303–309.
15. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
16. *Langholm Jensen J., Mølgaard A., Navarro Poulsen J.C., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjernø K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S.* // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.
17. *Higgins D.R., Busser K., Comiskey J., Whittier P.S., Purcell T.J., Hoeffler J.P.* // Methods Mol. Biol. 1998. V.103. P. 41–53.

Preparation of Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*) Chymosin in the Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii* and Characterization of the Recombinant Enzyme

S. Yu. Filkin[a], N. V. Chertova[a], S. S. Zatsepin[a], E. G. Sadykhov[a], A. N. Fedorov[a], and A. V. Lipkin[a, *]

[a] *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: lipus57@yahoo.com*

The main purpose of this work was the purification a producer strain of recombinant beluga whale (*Delphinapterus leucas*) chymosin and the investigation of physico-chemical properties of recombinant beluga whale chymosin. We have obtained a producer strain *Komagataella phaffii* with productivity of 80 mg/L. The specific activity of the recombinant beluga chymosin was 55 IMCU/mg, which is significantly lower than that of recombinant bovine chymosin. The beluga whale chymosin has a high nonspecific proteolytic activity, which reduces the value of this enzyme for food industry. Apparently, the amino acid substitutions K221M and K294Q are critically important and lead to a lower binding of casein micelles to the recombinant chymosin of the beluga whale.

Keywords: chymosin, *Pichia pastoris*, methylotrophic yeast, beluga whale

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 235–244

УДК 579.25

ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИЙ РОДА *Raoultella*

© 2021 г. Н. В. Жарикова[1, *], Т. Р. Ясаков[1], Е. Ю. Журенко[1], В. В. Коробов[1], Т. В. Маркушева[1]

[1]*Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия*

**e-mail: puzzle111@yandex.ru*

Поступила в редакцию 17.08.2020 г.
После доработки 27.11.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Представители вида *Raoultella planticola*, выделенные из почв, загрязненных отходами химического производства, использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную/2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии. Установлено, что клетки штаммов 33-4ch, 36D и 36T содержали плазмиды, обозначенные pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T соответственно. Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов показал, что pRP33-4ch и pRP36T, вероятно, являлись одной и той же плазмидой, в то время как в профилях рестрикции pRP36D содержались дополнительные фрагменты. Методом элиминации плазмид установлено, что гены деградации хлорфеноксиуксусных кислот имели внехромосомную локализацию. ПЦР-анализ показал отсутствие в геномах исследуемых штаммов известных генов инициации (*tfdA* и *tftA*) конверсии хлорфеноксиуксусных кислот. Идентифицированные промежуточные метаболиты (хлорфеноксиуксусная, феноксиуксусная кислоты и 2-кето-3-метил-муконовый полуальдегид) свидетельствовали о способности штаммов 33-4ch, 36D и 36T осуществлять полное дехлорирование ароматического кольца субстрата с последующим его *мета*-расщеплением.

Ключевые слова: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, плазмида деградации, *tfd*, *tft*, 2-гидроксимуконовый полуальдегид

DOI: 10.31857/S0555109921030156

2,4-Дихлорфеноксиуксусная (**2,4-Д**) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (**2,4,5-Т**) кислоты относятся к группе синтетических ауксинов, которые с конца второй мировой войны широко используются в качестве действующих агентов селективных гербицидов. Масштабное применение этих агрохимикатов привело к адаптации к ним почвенной микробиоты и селекции бактерий, способных к их активной деградации. Известно, что такие процессы идут, в основном, на уровне генов реакций первичного окисления субстратов, которые часто локализуются на внехромосомных элементах, что объясняет механизмы их распространения среди бактериальных популяций [1].

Известно, что в зависимости от степени галогенированности субстрата аэробная деградация хлороароматических соединений, в том числе и хлорфеноксиуксусных кислот, может пойти двумя основными метаболическими путями. Бактерии разлагают моно- и дихлорированные субстраты обычно по хлоркатехольному пути с последующим *орто*-расщеплением ароматического кольца [2]. Классический путь бактериальной деградации 2,4-Д штаммом *Cupriavidus necator* (ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* и *Wautersia eutropha*) JMP134, локализованный на плазмиде pJP4, начинается с образования 2,4-дихлорфенола (**2,4-ДХФ**) [3, 4]. Стадия инициации катализируется α-кетоглутарат(**α-кГ**)-зависимой диоксигеназой, кодируемой геном *tfdA*. 2,4-Дихлорфенолгидролаза (**TfdB**) осуществляет трансформацию 2,4-ДХФ до 3,5-дихлоркатехола (**3,5-ДХК**), а *tfdCDEF*-кодируемые ферменты – дальнейшую конверсию последнего через модифицированный *орто*-путь расщепления вплоть до β-кетоадипата (рис. 1а). Такой путь установлен для большинства известных к настоящему моменту бактериальных деструкторов 2,4-Д, относящихся к β- и γ-подклассам *Proteobacteria* родов *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodoferax, Variovorax*и и др., полученных из почв сельскохозяйственного и промышленного назначения [5]. Для многих штаммов этой группы, так же как для штамма *C. necator* JMP134, характерна плазмидная локализация *tfdA*, *tfdB* и *tfdCDEF* детерминант деградации [6]. Необходимо отметить, что существуют другие группы

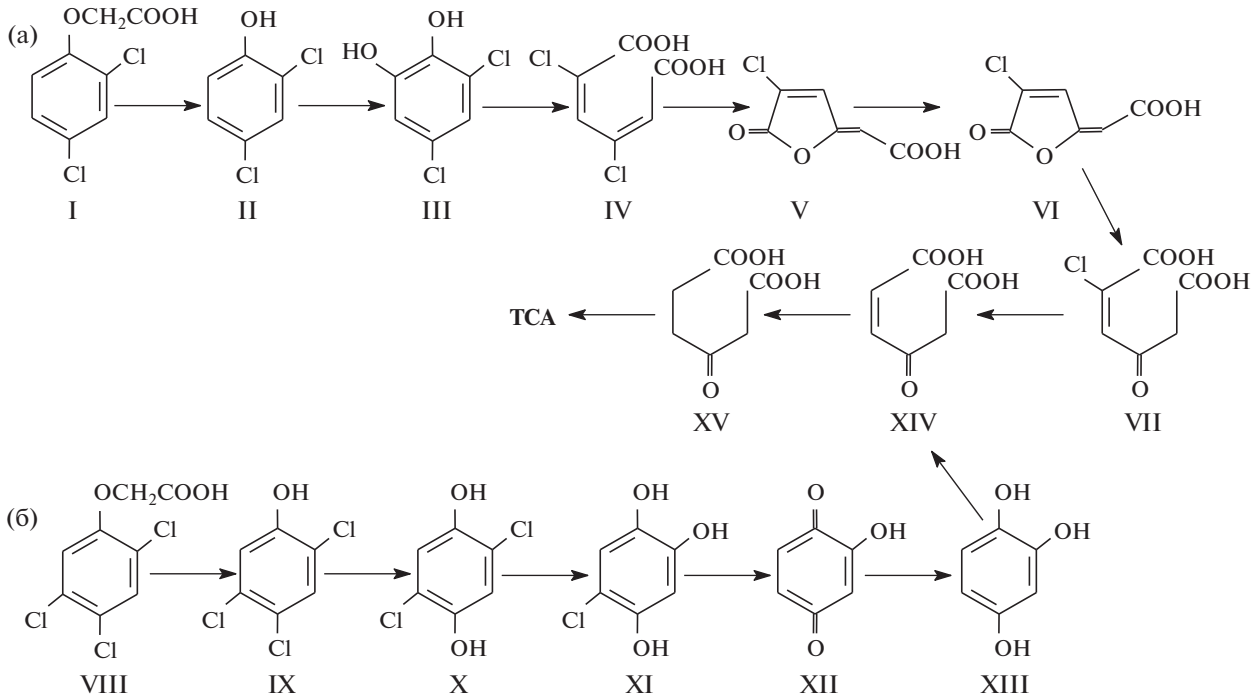


Рис. 1. Пути аэробной деградации хлорированных феноксиуксусных кислот у бактерий: а – 2,4-Д штамма *C. necator* JMP134 [3], б – 2,4,5-Т штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 [8–10]. Условные обозначения: I – 2,4-Д; II – 2,4-дихлорфенол; III – 2,4-дихлоркатехол; IV – 2,4-дихлор-*цис*, *цис*-муконат; V – *транс*-2-хлордиенлактон; VI – *цис*-2-хлордиенлактон; VII – 2-хлормалеилуксусная кислота; VIII – 2,4,5-Т; IX – 2,4,5-трихлорфенол; X – 2,5-дихлоргидрохинон; XI – 5-хлоргидроксигидрохинон; XII – 2-гидрокси-1,4-бензохинон; XIII – гидроксигидрохинон; XIV – малеилуксусная кислота; XV – β-кетоадипат; TCA – цикл трикарбоновых кислот.

деструкторов 2,4-Д, которые содержат или гомолог *tfdA* гена – *tfdA*α или негомологичные гены – *cadAB,* но все они строго принадлежат к таксону α-*Proteobacteria*.

Второй основной метаболический путь установлен для бактерий, растущих на полигалогенированных ароматических субстратах, где ключевым метаболитом является не хлоркатехол, а хлорированные гидрохинон и/или гидроксигидрохинон. В дальнейшем происходит расщепление ароматического кольца с образованием малеилацетата, а затем – β-кетоадипата [7]. Подобным образом происходит конверсия 2,4,5-Т у штамма *Burkholderia phenoliruptrix* (ранее *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*) AC1100 (рис. 1б), гены деградации которого имеют хромосомную локализацию [8–10].

Стадия инициации происходит в результате монооксигеназной активности 2,4,5-Т-оксигеназы, которая превращает 2,4,5-Т в 2,4,5-трихлорфенол [11]. Гены, кодирующие α- и β-субъединицы многокомпонентной 2,4,5-Т оксигеназы, отнесенной к оксигеназам Риске-типа, получили обозначение *tftAB* и позднее были локализованы еще у нескольких штаммов рода *Burkholderia* [12, 13].

Цель работы – исследование катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот и локализации генов деградации у бактерий рода *Raoultella*.

МЕТОДИКА

Объектами исследований служили три природных бактериальных штамма 33-4ch, 36D и 36T, изолированные из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства (Уфа, Россия).

Выделение геномной ДНК, амплификация частичной последовательности гена 16S рРНК и секвенирование были описаны ранее в статье Жариковой с соавт. [14], дальнейший анализ проведен в работе Коробова с соавт. [15].

Методики выделения плазмидной ДНК, ее рестрикционный анализ и элиминация плазмид из клеток штаммов с использованием бромистого этидия опубликованы ранее [16].

Лизис клеток и выделение ДНК-матриц для ПЦР-реакций получали нагреванием бактериальных клеток 7 мин до 95°C, с последующим осветлением клеточного лизата центрифугированием в течение 5 мин на MiniSpin (“Eppendorf”, США) при 9840 g.

ПЦР проводили с использованием амплификатора ThermalCycler (“Applied Biosysteme”, США) в объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис-HCl (pH 8.3), 17 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.001%-ный Твин 20, 2.5 мМ $MgCl_2$, 25 пмоль каждого праймера, 2 мМ дНТФ – 1.0 мкл и 1.25 единиц *Taq*-полимеразы

("Sigma-Aldrich", США), ДНК-матрица – 1 мкл осветленного клеточного лизата с концентраций геномной ДНК ~25 нг.

Амплификации гена *tfdA* проводили по следующей программе: 1) 95°C – 6 мин; 2) 94°C – 45 с; 3) 64°C – 30 с; 4) 72°C – 2 мин; 5) повтор 2, 3, 4 – 50 циклов; 6) 72°C – 2 мин. Использовали праймеры *tfdA_F*, 5' – GAGCACTACGCACTGAACTCCCG – 3', *tfdA*_R, 5' – CTTCGGCCACCGGAAGGCCT – 3' [17]. В качестве положительного контроля служила pJP4, плазмида деградации 2,4-Д.

Для амплификации гена *tftA* использовали следующие праймеры: *tftA_F* – 5' – ACATTCGACG-GGAATTGGAA – 3', *tftA_R* – 5' – AGGATT-GAAGAAATCCTGATA – 3', предложенные Хуонг с соавт. [13]. Реакцию проводили по следующей схеме: 94°C – 2 мин; 94°C – 1 мин; 50°C – 1 мин; 72°C – 1 мин; повтор 2, 3, 4 – 30 циклов; 72°C – 2 мин. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W, любезно предоставленную автором Хуонгом [13], с известной нуклеотидной последовательностью *tftA*.

Культуры бактерий (накопительные и чистые) выращивали в конических колбах (250 мл) на минимальной солевой среде M9 [18], содержащей в качестве единственного источника углерода 2,4-Д/2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Культивирование проводили при температуре 28°C в термостатируемой установке УВМТ-12-250 ("Элион", Россия) при 120 об/мин. Интенсивность роста культуры оценивали по оптической плотности ($ОП_{590}$) клеточной суспензии с использованием фотоколориметра КФК-2 (Россия).

Определение количества хлорфеноксиуксусных кислот в культуральной жидкости проводили согласно руководству [19] с небольшими модификациями. Для анализов отбирали по 5 мл культуральной жидкости, освобождали от клеток центрифугированием при 3600 g в течение 30 мин. Супернатант подкисляли 2 н соляной кислотой до pH 2.0 и добавляли в пробы в качестве внутреннего стандарта 2,4,5-Т (при определении количества 2,4-Д) и 2,4-Д (при определении 2,4,5-Т) до конечной концентрации каждой метки 100 мг/л. Затем из проб хлорфеноксиуксусные кислоты экстрагировали трехкратно равными объемами хлороформа. После испарения хлороформа экстракты метилировали свежеприготовленным диазометаном и переводили в гексан (2 мл). Половину полученного образца использовали для определения интермедиатов, а остальное – для фракционирования методом тонкослойной хроматографии на пластинах силуфол UV-254 ("Chemapol", Чехия). Сканирование образцов проводили при длине волны 260–280 нм в камере Хромоскана ("Joyce-Loebl", Великобритания). Содержание хлорфеноксиуксусных кислот определяли по калибровочному графику для чистого стандарта.

Продукты метаболизма хлорфеноксиуксусных кислот определяли на хромато-масс-спектрометре NERMAG R-30-10 с хроматографом Carlo Erba MEGA 536010 ("Hewlett-Packard", США). Условия определения: капиллярная колонка 15 м × × 0.25 мм, привитая фаза ДВ-1, растворитель гексан, температура инжектора 200°C, интерфейса 250°C, колонки от 80 до 250°C, скорость нагрева 3.5 мин. Масс-спектры электронного удара получали при температуре источника ионов, равной 250°C, энергии электронов, равной 70 эВ.

Интермедиаты идентифицировали с использованием системы обработки данных MS HP ChemStation, содержащей библиотеку из 138000 масс-спектров Base Date WILEY138L.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы 36D и 36T были испытаны на способность использовать 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Третий штамм – 33-4ch, уже описанный ранее как деструктор 2,4,5-Т [20], культивировали только на 2,4-Д. Периодическое культивирование штаммов проводили в течение недели. Значительная убыль концентрации субстрата наблюдалась в период активного роста штаммов (1–2 сут), а после 5 сут она практически не менялась (рис. 2). Таким образом, все исследуемые штаммы проявили способность к конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т, однако более предпочтительным для них, особенно для 36D, оказался последний субстрат.

В разное время активность штаммов-деструкторов 2,4-Д исследовали в условиях использования 2,4-Д как единственного источника углерода и энергии в концентрации от нескольких мг/л до нескольких сотен мг/л или даже г/л [5].

В то же время, в отличие от хорошо изученных и довольно распространенных бактерий, метаболизирующих 2,4-Д, известно на порядок меньше чистых культур, осуществляющих конверсию более хлорированного производного – 2,4,5-Т [21].

Впервые такой штамм AC1100 был получен с использованием технологии так называемого плазмид-ассоциированного молекулярного бридинга. Активно растущая культура AC1100 (таксономия этого штамма менялась: ранее была идентифицирована как *Pseudomonas cepacia*, потом *Burkholderia cepacia*, а затем *Burkholderia phenoliruptrix*) метаболизировала более 97% 2,4,5-Т, присутствующего в среде в концентрации 1 мг/мл, в течение 6 сут. Однако способность к разложению 2,4,5-Т у штамма AC1100 оказалась нестабильной и само-

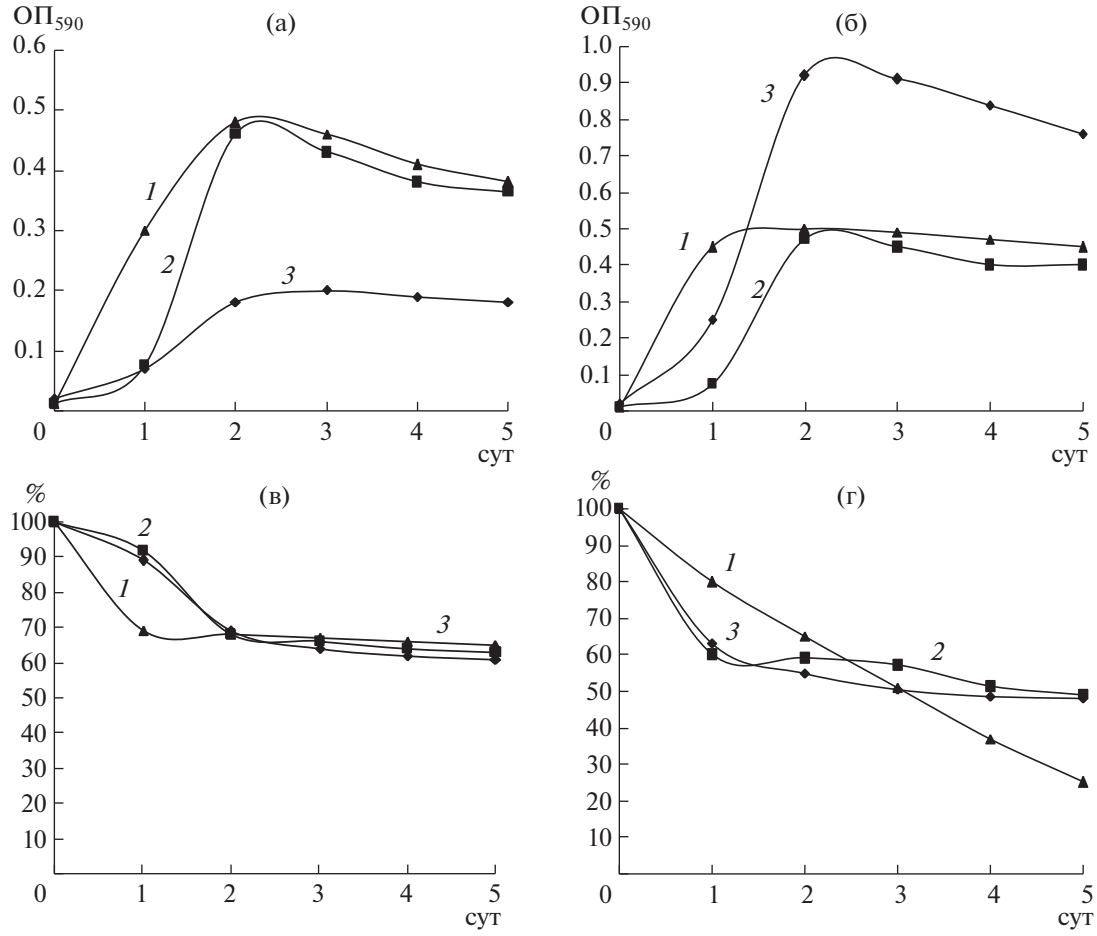


Рис. 2. Зависимость значений $ОП_{590}$ культуральной жидкости штаммов *R. planticola* 36 D (*1*), *R. planticola* 33 4ch (*2*) и *R. planticola* 36T (*3*) при выращивании культур на 2,4-Д (а) и 2,4,5-Т (б), динамика концентрации 2,4-Д (в) и 2,4,5-Т(г) в зависимости от времени.

произвольно терялась с высокой частотой, что, скорее всего, было связано с его гибридным происхождением [22].

Второй штамм *Nocardioides simplex* 3E, изолированный в 1990 г., был способен использовать 2,4,5-Т при достаточно высоких концентрациях – до 4.0 мМ, однако полная деградация ксенобиотика происходила только при концентрации 0.04 мМ [23].

Относительно недавно, в 2007 г., из почв Вьетнама были выделены 353 штамма-деструктора 2,4-Д и 2,4,5-Т, От общего количества изолированных штаммов 65% оказались деструкторами 2,4,5-Т. Способность всех изолятов к деградации хлорфеноксиуксусных кислот проверялась на солевой среде, содержащей 100 мг/л 2,4-Д/2,4,5-Т [13].

Таким образом, исследованные в данной работе штаммы (особенно 36D) оказались более перспективными в качестве потенциальных агентов утилизации 2,4,5-Т и в дальнейшем могут быть использованы для решения проблем ремедиации территорий загрязненным этим гербицидом.

Известно, что конверсию 2,4-Д и 2,4,5-Т, как правило, контролируют разные генные кластеры, локализация которых часто коррелируют с таксономическим положением штамма.

Для культур 36D и 36T были определены практически полные последовательности (1439 п.н., соответствующие позициям 42-1481 по номенклатуре *E. coli*) амплификатов генов, кодирующих 16S рРНК, которые оказались идентичными друг другу и 16S рДНК штамма *Raoultella planticola* 33-4ch (DQ333356), депонированной в базе данных GenBank ранее [20].

Сравнение последовательностей 16S рДНК исследуемых штаммов и двух видов, принадлежащих к роду *Klebsilella* – *K. planticola* и *K. ornithinolytica,* продемонстрировало высокую степень их сходства (идентичность составила 99.5–99.8 и 99.3–99.6% соответственно).

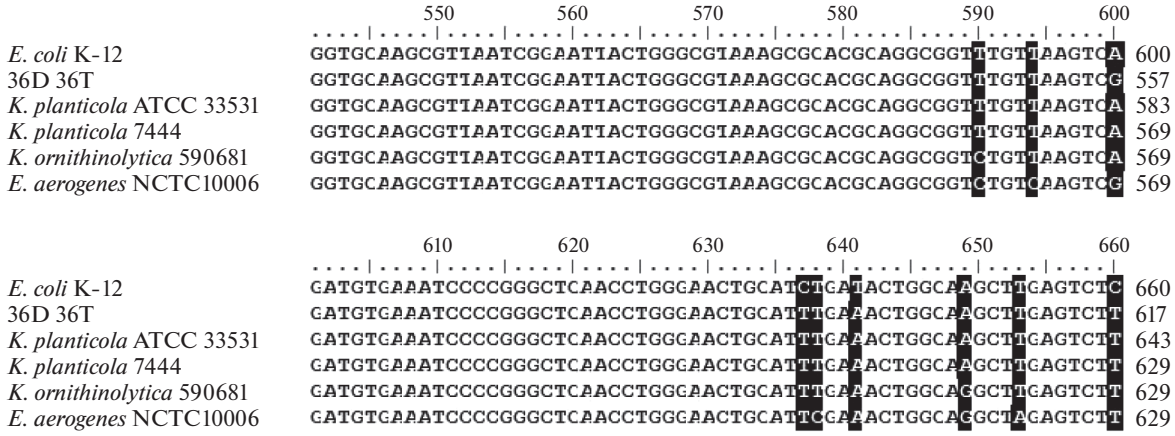


Рис. 3. Сравнение частичных нуклеотидных последовательностей вариабельной области V7 16S рДНК штаммов 36D (а) и 36T (б) и родственных культур *Escherichia coli* K-12, *Klebsilella planticola* ATCC 33531, *Klebsilella planticola* 7444, *Klebsiella ornithinolytica* 590681 и *Enterobacter aerogenes* NCTC 10006. Черным цветом выделены сигнатурные нуклеотиды.

Известно, что для представителей рода *Klebsilella* внутривидовые уровни сходства последовательностей 16S рДНК обычно превышают 99.0%. В то же время уровни межвидового сходства варьируют от 96.6 до 98.6% с одним исключением: сходство последовательностей 16S рДНК между *K. planticola* и *K. ornithinolytica* достигает внутривидового уровня 99.0–99.4% [24]. Некоторые исследователи даже не считают их разделение на два вида оправданным и рассматривают *K. ornithinolytica* как биогруппу *K. planticola*.

В пределах 16S рДНК у представителей рода *Klebsiella* выявлено несколько вариабельных областей, на протяжении которых были обнаружены сигнатурные нуклеотиды, которые оказались специфичны для каждого вида этого рода. В вариабельной области V7 (позиции 489–653) были идентифицированы только два нуклеотида в пределах целой последовательности 16S рДНК, по которым можно различить представителей видов *K. planticola* и *K. ornithinolytica* [24] (рис. 3).

Таким образом, наличие специфичных нуклеотидов в положениях 590 и 649 в последовательностях штаммов 36D и 36T свидетельствовало об их принадлежности к виду *K. planticola*. Так как ранее три вида рода – *K. planticola*, *K. ornithinolytica* и *K. terrigena* были реклассифицированы в новый род *Raoultella* [25], то исследуемые штаммы были идентифицированы как *Raoultella planticola* 36D и *Raoultella planticola* 36T.

Известно, что у β- и γ-подклассов *Proteobacteria* за деградацию 2,4-Д отвечает *tfd*-группа генов, которые часто локализованы на плазмидах [5]. Однако среди деструкторов γ-*Proteobacteria* ранее не идентифицировались штаммы, принадлежащие к роду *Raoultella* или реклассифицированые по принадлежности к данному роду виды *K. planticola*, *K. ornithinolytica* и *K. terrigena*.

Поиск внехромосомных элементов в клетках штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T выявил наличие плазмид, обозначенных нами как pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T соответственно. С целью оценки их разнообразия был проведен анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (**ПДРФ**) с использованием *BamH* I, *Hind* III и *Pst* I ферментов (рис. 4).

Профили рестрикции pRP33-4ch и pRP36T по всем трем ферментам оказались идентичными, в то время как в профиле плазмиды pRP36D, в целом несомненно сходном с предыдущими, содержались дополнительные фрагменты (дорожки *6* на рис. 4а–4в). Скорее всего, pRP33-4ch и pRP36T являются одной и той же плазмидой (или очень близкими), а pRP36D – ее вариантом, которая “захватила” некую нуклеотидную последовательность.

Размеры плазмид составили для pRP33-4ch и pRP36T 110, а для pRP36D – 130 т. п. н. Известные плазмиды деградации β- и γ-подклассов *Proteobacteria* обладали сопоставимыми размерами, например: pJP4 (88 т. п. н.), pIJB1 (102 т. п. н.), pEST4011 (70 т. п. н.) и pMSB1 (80 т. п. н.) штаммов *C. necator* JMP134, *Burkholderia cepacia* 2a, *Achromobacter xylosoxidans* EST4002 и *Azotobacter chroococcum* MSB-1 соответственно [3, 26–28].

Для локализации детерминант катаболизма 2,4-Д и 2,4,5-Т в геномах штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T применялся метод элиминации плазмид. В случае необратимой утраты исследуемых свойств считали, что детерминанты деградации расположены вне хромосомы.

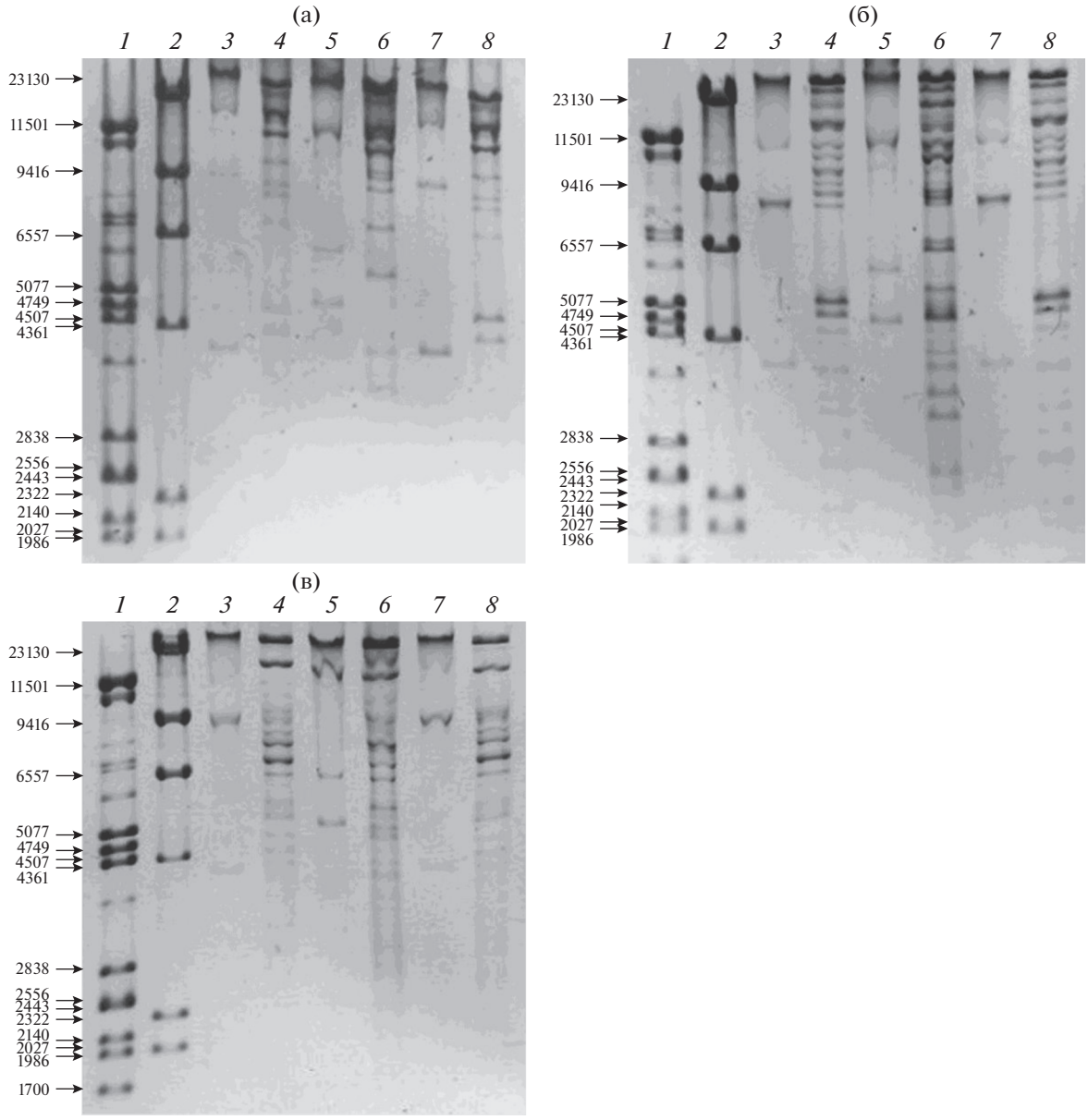


Рис. 4. Электрофорез плазмид pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T после обработки *BamH* I (а), *Hind* III (б) и *Pst* I (в) ферментами рестрикции: *1*, *2* – ДНК- маркеры λ*Pst* I и λ*Hind* III соответственно; *3*, *5*, *7* – нативные препараты pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T; *4*, *6*, *8* – рестриктированные препараты pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T. Стрелками показаны размеры фрагментов ДНК маркеров.

Бесплазмидные клетки были получены при использовании концентрации бромистого этидия 200 мкг/мл, а сам факт элиминации подтверждался отсутствием плазмид в препаратах внехромосомной ДНК.

В ходе дальнейшей работы бесплазмидные варианты исследуемых штаммов проверялись на способность использовать 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом отдельные колонии высевались на агаризованную минимальную среду М9 с 2,4-Д/2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Контролем в эксперименте служил рост исходных штаммов на тех же средах и их бесплазмидных вариантов на богатой среде (МПА) (табл. 1).

Бесплазмидные варианты штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T не были способны использовать 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Следовательно, детерминанты катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот расположены на

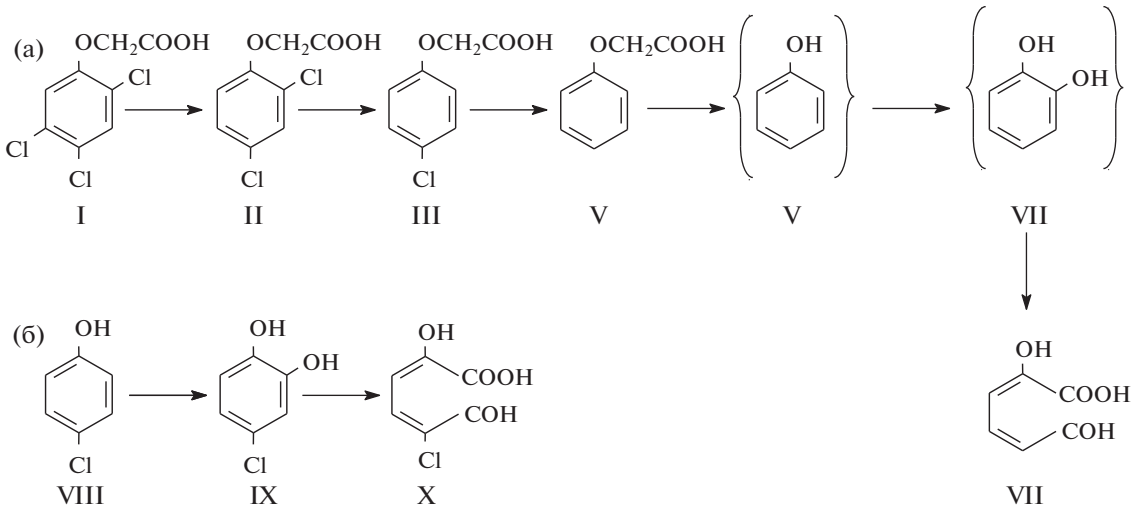


Рис. 5. Схемы вероятного метаболизма: а – 2,4-Д и 2,4,5-Т у штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T; б – 4-хлорфенола у культуры *C. testosteroni* JH5 [30]. Условные обозначения: I – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, II – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, III – 4-хлорфеноксиуксусная кислота, IV – феноксиуксусная кислота, V – фенол, VI – катехол, VII– 2-гидроксимуконовый полуальдегид VIII – 4-хлорфенол, IX – 4-хлоркатехол, X – 5-хлор-2-гидроксимуконовый полуальдегид, в скобках показаны предполагаемые метаболиты.

плазмидах pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T соответственно.

Известно, что у групп бактериальных деструкторов 2,4-Д и 2,4,5-Т стадии инициации катализируют α-кетоглутарат-зависимая диоксигеназа (**TfdA**) и 2,4,5-Т-оксигеназа (**TftAB**) соответственно. Однако ПЦР-анализ с использованием праймеров, разработанных на кодирующие их гены *tfdA* [17] и *tftA* [13] не выявил их наличия в геномной ДНК исследуемых штаммов, в то время как целевые ПЦР-продукты присутствовали в обоих положительных контролях.

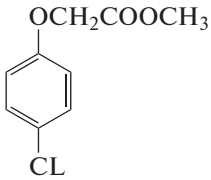
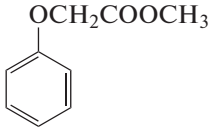
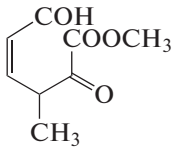
Поиск промежуточных метаболитов в средах культивирования изучаемых штаммов в условиях использования 2,4-Д и 2,4,5-Т как единственных источников углерода и энергии показал присутствие хлорфеноксиуксусной, феноксиуксусной и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой (2-кето-3-метил-муконовый полуальдегид) кислот (табл. 2). Ранее для культуры *R. planticola* 33-4ch были установлены идентичные интермедиаты деградации 2,4,5-Т [20]. Следовательно, конверсия 2,4-Д и 2,4,5-Т у штаммов *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T и *R. planticola* 33-4ch, вероятно, происходит одним общим путем через одинаковые промежуточные метаболиты (рис. 5а).

Обнаружение в среде культивирования исследуемых штаммов 4-хлорфеноксиуксусной и феноксиуксусной кислот показало, что на начальной стадии конверсии хлорфеноксиуксусных кислот происходило восстановительное дехлорирование субстрата, а не его гидроксилирование с отщепле-

Таблица 1. Оценка способности штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T к конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т после элиминации плазмид

Штамм	Оценка роста штаммов на средах		
	МПА	М9 с добавлением	
		2,4-Д	2,4,5-Т
33-4ch (pRP33-4ch$^-$)	+	–	–
33-4ch (pRP33-4ch$^+$) контроль	+	+	+
36D (pRP36D$^-$)	+	–	–
36D (pRP36D$^+$) контроль	+	+	+
36T (pRP36T$^-$)	+	–	–
36T (pRP36T$^+$) контроль	+	+	+

Таблица 2. Масс-спектрометрический анализ метаболитов конверсии 2,4-Д, и 2,4,5-Т у штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T

Метаболит	Основные пики в масс-спектре *m/z*, %	33-4ch		36D		36T	
		2,4-Д	2,4,5-Т[20]	2,4-Д	2,4,5-Т	2,4-Д	2,4,5-Т
 Метиловый эфир 4-хлорфеноксиуксусной кислоты	M^+ 200 (100), 202 (32), 143 (32), 141 (100), 141 (100), 113 (38), 111 (58)	+	+	+	+	+	+
 Метиловый эфир феноксиуксусной кислоты	M^+ 166 (50), 107 (120), 77 (80)	+	+	+	+	+	+
 Метиловый эфир 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты	M^+ 156 (2), 126 (6), 111 (10), 97 (20), 95 (20),85 (21), 83 (21), 71 (16), 57 (100), 44 (50)	+	+	+	+	+	+

нием остатка уксусной кислоты и образованием соответствующего хлорфенола как при деградации субстратов штаммами *C. necator*JMP134 и *B. phenoliruptrix* AC1100, рассмотренными выше (рис. 1).

Реакции восстановительного дехлорирования описаны в путях деградации хлорфеноксиуксусных кислот для двух штаммов: *N. simplex* 3E [23] и *A. chroococcum* [29], однако кодирующие их гены до сих пор не известны. Стоит отметить, что диссимиляция 2,4-Д у *A. chroococcum* MSB-1, также как у штаммов 33-4ch, 36D и 36T, контролируется плазмидой pMSB1 [28].

По современным представлениям ключевой стадией конверсии хлорароматических соединений является раскрытие ароматического кольца. Эта реакция катализируется диоксигеназами, и может происходить между гидроксильными группами (*орто*-расщепление) или по соседству с одним из гидроксилов (*мета*-расщепление) [2, 7].

Обнаруженный метаболит конверсии хлорфеноксиуксусных кислот с открытой углеродной цепью (2-кето-3-метилмуконовый полуальдегид) является метилированным производным 2-гидроксимуконового полуальдегида. Последний представляет собой классический интермедиат *мета*-расщепления ароматического кольца катехола, в основном характерного для метаболизма метилированных ароматических соединений. Однако известны случаи, когда бактерии использовали *мета*-путь для конверсии хлорфенолов. Так, у штамма *Comamonas testosteroni* JH5 при минерализации 4-хлорфенола был идентифицирован 5-хлор-2-гидроксимуконовый полуальдегид – метаболит *мета*-расщепления хлорированного катехола (рис. 5б) [30].

Таким образом, штаммы *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T, вероятно, осуществляют полное дехлорирование субстрата с последующим *мета*-расщепления его ароматического кольца (рис. 5а). Ранее подобный путь был описан для культуры *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 [31].

Исследованные в данной работе штаммы рода *Raoultella* проявляют полисубстратную активностью в отношении сразу двух хлорфеноксиуксусных кислот. Не смотря на то, что 2,4,5-Т считается более сложным субстратом для бактерий и известно немного чистых культур природных штаммов, способных к полной его деградации, оказалось, что

изучаемые культуры (особенно 36D) являются более эффективными деструкторами 2,4,5-Т, а не 2,4-Д. Поскольку часто встает проблема очистки экотопов от целого спектра загрязнителей хлороматической природы, в том числе 2,4-Д и 2,4,5-Т, штаммы *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T особенно интересны как потенциально полисубстратные агенты ремедиации таких территорий.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН “Агидель”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Phale P.S., Shah B.A., Malhotra H.* // Genes. 2019. V. 10. № 8. P. 569. https://doi.org/10.3390/genes10080569
2. *Arora P.K., Bae H.* // Microb. Cell. Fact. 2014. V. 13. № 31. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31
3. *Don R.H., Weightman A.J., Knackmuss H.J, Timmis K.N.* // J. Bacteriol. 1985. V. 161. № 3. P. 85–90.
4. *Laemmli C., Werlen C., van der Meer JR.* // Arch. Microbiol. 2004. V. 181. № 2. P. 112–121. https://doi.org/10.1007/s00203-003-0634-4
5. *Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В.* // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 5. С. 514–528. https://doi.org/10.7868/S0042132417050076
6. *Kumar A., Trefault N., Olaniran A.O.* // Critical Reviews in Microbiology. 2016. V. 42. № 2. P. 194–208. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.917068
7. *Enguita F.J., Leitão A.L.* // Biomed Res. Int. 2013. V. 2013. https://doi.org/10.1155/2013/542168
8. *Danganan C.E., Ye R.W., Daubaras D.L., Xun L., Chakrabarty A.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 11. P. 4100–4106.
9. *Daubaras D.L., Saido K., Chakrabarty A.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4276–4279.
10. *Zaborina O., Daubaras D.L., Zago A., Xun L., Saido K., Klem T., Nikolic D., Chakrabarty A.M.* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 17. P. 4667–4675.
11. *Xun L., Wagnon K.B.* // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 9. P. 3499–3502.
12. *Rice J.F., Menn F.-M., Hay A.G., Sanseverino J., Sayler G.S.* // Biodegradation. 2005. V. 16. P. 501–512. https://doi.org/10.1007/s10532-004-6186-8
13. *Huong N.L., Itoh K., Suyama K.* // Microbes Environ. 2007. V. 22. № 3. P. 243–256. https://doi.org/10.1264/jsme2.22.243
14. *Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T. V.* // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. № 4. P. 660–671. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.014
15. *Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В.* // Вестник Московского университета. 2017. Серия 16: Биология. Т. 72. № 4. С. 235–240. https://doi.org/10.3103/S0096392517040083
16. *Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р.* // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1469–1476.
17. *Bælum J., Henriksen T., Christian H., Hansen B., Jacobsen C.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 2. P. 1476–1486. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1476-1486.2006
18. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
19. Методы определения микроколичеств пестицидов. / Ред. М.А. Клисенко М.: Медицина, 1984. 256 с. 20.
20. *Жарикова Н.В., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Ситдикова Л.Р., Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 292–297. https://doi.org/10.1134/S0003683806030069
21. *Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В.* // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 292–305. https://doi.org/10.7868/S0016675818030025
22. *Kilbane J.J., Chatterjee D.K., Karns J.S., Kellogg S.T., Chakrabarty A.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78. https://doi.org/10.1128/AEM.44.1.72-78.1982
23. *Golovleva L.A., Pertsova R.N., Evtushenko L.I., Baskunov B.P.* // Biodegradation. 1990. V. 1. № 4. P. 263–271.
24. *Boye K., Hansen D.* // Int. J. Med. Microbiol. 2003. V. 292. № 7–8. P. 495–503. https://doi.org/10.1078/1438-4221-00228
25. *Drancourt M., Bollet C., Carta A., Rousselier P.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. № 3. P. 925–932. https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925
26. *Xia X.S., Smith A.R., BruceI. J.* // FEMS Microbiol. Lett. 1996. V. 144. № 2–3. P. 203–206. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08531.x
27. *Vedler E., Koiv V., Heinaru A.* // Gene. 2000. V. 255. P. 281–288. https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00329-2
28. *Balajee S., Mahadevan A.* // FEMS Microbiol. Lett. 1989. V. 65. № 1–2. P. 223–228. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03626.x
29. *Balajee S., Mahadevan A.* // Xenobiotica. 1990. V. 20. № 6. P. 607–617. https://doi.org/10.3109/00498259009046876
30. *Hollender J., Hopp J., Dott W.* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63 № 11. P. 4567–4572. https://doi.org/10.1128/AEM.63.11.4567-4572.1997
31. *Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Стариков С.Н., Сагитова А.И., Маркушева Т.В.* // Микробиология. 2018. Т. 87. № 1. С. 93–96. https://doi.org/10.7868/S002636561801010X

Chlorophenoxyacetic Acid Degradation Plasmids of Bacteria of the Genus *Raoultella*

N. V. Zharikova[a, *], T. R. Iasakov[a], E. Yu. Zhurenko[a], V. V. Korobov[a], and T. V. Markusheva[a]

[a] *Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

**e-mail: puzzle111@yandex.ru*

Members of the *Raoultella planticola* species isolated from soils contaminated with chemical waste were capable to use 2,4-dichlorophenoxyacetic/2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid as the sole source of carbon and energy. It was found that cells of strains 33-4ch, 36D and 36T contained plasmids which were designated as pRP33-4ch, pRP36D and pRP36T, respectively. RFLP analysis showed that pRP33-4ch and pRP36T were probably the same plasmid, while pRP36D contained in the restriction profiles additional fragments. Using the method of elimination of plasmids, it was found that the genes for the degradation of chlorophenoxyacetic acids have extrachromosomal localization. PCR analysis showed the absence in the genomes of the studied strains of known initiation genes (*tfdA* and *tftA*) for the conversion of chlorophenoxyacetic acids. The identified intermediate metabolites (chlorophenoxyacetic and phenoxyacetic acids and 2-keto-3-methylmuconic semialdehyde) indicated that strains 33-4ch, 36D and 36T perform complete dechlorination of the aromatic ring of the substrate with its subsequent *meta*-cleavage.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, degradation plasmid, *tfd*, *tft*, 2-hydroxymuconic semialdehyde

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 245–250

УДК 577.15

РЕКОНСТРУКЦИЯ HYDSL ГИДРОГЕНАЗЫ *Thiocapsa roseopersicina* BBS ПОСЛЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИАНИДОМ

© 2021 г. Н. А. Зорин[1], А. Н. Хуснутдинова[1], А. С. Стародубов[1], И. И. Проскуряков[1], А. А. Цыганков[1, *]

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

**e-mail: ttt@issp.serpukhov.su*

Поступила в редакцию 06.10.2020 г.
После доработки 27.11.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

В работе показано, что после длительной обработки цианидом каталитический центр HydSL гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* остается активным. Обнаружено, что при инкубации гидрогеназы, обработанной цианидом, в присутствии бета-меркаптоэтанола, трехвалентного железа и сульфида натрия активность гидрогеназы в реакции окисления водорода в присутствии метилвиологена восстанавливалась. Процесс реконструкции активности зависел от времени и достигал максимального значения (~60%) в течение 30 мин при комнатной температуре. При этом в спектре поглощения гидрогеназы появлялась полоса поглощения при 420 нм, присутствующая в нативной гидрогеназе и исчезающая после обработки цианидом, что свидетельствовало о реконструкции железосерных кластеров. Таким образом, вместо выращивания бактерий в присутствии изотопа железа можно замещать ^{56}Fe на ^{57}Fe в выделенном ферменте, что позволит использовать значительно меньшие количества ^{57}Fe.

Ключевые слова: гидрогеназа, водород, реакция изотопного обмена, NiFe-активный центр, FeS-кластеры, реконструкция ферментов

DOI: 10.31857/S0555109921030168

Гидрогеназами называют большую группу металлоферментов, катализирующих обратимую реакцию восстановления протонов до молекулярного водорода.

Различают три группы гидрогеназ по содержанию металлов в активном центре: NiFe-гидрогеназы, содержащие биметаллический железо-никелевый активный центр, FeFe-гидрогеназы, содержащие двухатомный кластер железа в активном центре и Fe-гидрогеназы, не содержащие металлов в белковой глобуле, но включающие Fe-содержащий кофактор [1–3]. 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. Атом железа в составе активного центра связан с тремя небелковыми двухатомными лигандами (одним CO-лигандом и двумя CN^--лигандами) [1].

Термостабильная гидрогеназа HydSL из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS (КФ: 1.12.99.6) относится к 1 группе, е подгруппе NiFe-гидрогеназ [3] и состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 64 и 34 kDa. NiFe-активный центр находится в большой субъединице (HydL) [1, 5], причем, как и у других NiFe-гидрогеназ содержит двухатомные CO и CN-лиганды [7]. Малая субъединица (HydS) содержит три FeS-кластера, которые образуют транспортную систему для внутримолекулярного переноса электронов между активным центром и поверхностью фермента. На основании анализа консервативных участков гидрогеназ подгруппы 1е был сделан вывод, что эти гидрогеназы содержат два 4Fe4S кластера (проксимальный и дистальный относительно активного центра) и 3Fe4S в качестве медианного кластера [1, 3]. Исследования FeS-кластеров у гидрогеназы *Aquifex aeolicus*, относящейся к 1е подгруппе, также подтвердило наличие именно этих кластеров [6], причем с помощью мессбауэровской спектроскопии обнаружено необычное $[4Fe4S]^{3+}$ состояние проксимального кластера.

Для HydSL гидрогеназы *Thiocapsa roseopersicina* таких работ не проводилось, хотя это могло бы

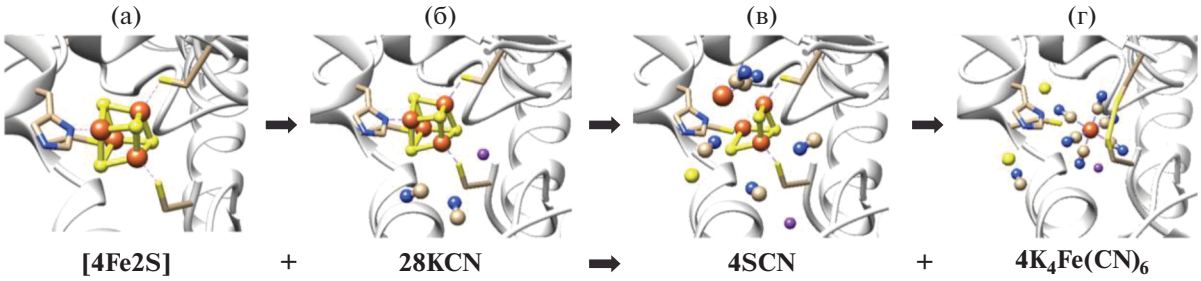


Рис. 1. Гипотетическая схема разрушения 4Fe4S кластера при действии цианида. (а) – нативный 4Fe4S кластер (на основе кластера из *Ralstonia eutropha*, pdb ID: 5MDJ); (б) – в присутствии цианида; (в) – частичное разрушение FeS кластера с образованием $Fe(CN)_2$ и SCN. (г) – полное разрушение кластера с образованием феррицианида и дисульфидных связей цистеинов. Рисунок сделан с использованием пакета программ CHIMERA.

дать существенную информацию о редокс состояниях FeS-кластеров при переносе электрона в процессе поглощения водорода. Использование мессбауэровской спектроскопии или ядерно-резонансной колебательной спектроскопии [7] для анализа редокс-состояний требует наличия в кластере изотопа ^{57}Fe. Для получения гидрогеназы с таким изотопом железа необходимо выращивание большого количества биомассы в присутствии только этого изотопа железа. Представляется перспективным поиск специфического ингибитора, разрушающего FeS-кластеры с последующей их реконструкцией в присутствии ^{57}Fe. Такой подход, в случае его реализации, является более экономичным с точки зрения использования ^{57}Fe.

Известны ингибиторы, разрушающие FeS-кластеры. В частности, показано, что продолжительное инкубирование гидрогеназы *T. roseopersicina* с цианидом вызывает потерю активности фермента в реакции поглощения водорода с метилвиологеном в качестве акцептора [8]. Это сопровождается разрушением железо-серных кластеров, и появлением в растворе ферроцианида. В качестве примера можно привести иллюстрацию разрушения 4Fe4S кластера под действием цианида (рис. 1). В то же время после обработки цианидом каталитический железо-никелевый центр по-прежнему содержит CO и CN^--лиганды [8]. Однако данные о каталитической активности активного центра после такого воздействия отсутствуют.

Реконструкция FeS-кластеров в различных белках после их разрушения возможна. Например, для ферредоксина показана возможность практически полного восстановления спектральных характеристик, функций и нативной структуры после их обработки соединениями ртути [9].

Цель работы – выявление каталитической активности NiFe -центра и подбор условий для реконструкции FeS-кластеров после длительной обработки гидрогеназы HydSL цианидом.

МЕТОДИКА

В работе использовали тяжелую воду (99.9% D_2O), цианид калия, метилвиологен и реактивы для электрофореза в ПААГ фирмы “Sigma-Aldrich” (США), фенилсефарозу CL-4B фирмы “Pharmacia” (Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу DE_{52} фирмы “Whatman” (Англия), и дитионит натрия фирмы “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы – отечественного производства марок х. ч. и ос. ч.

Клетки пурпурной серной бактерии *T. roseopersicina* BBS выращивали в анаэробных фотогетеротрофных условиях на модифицированной среде Пфеннига [10] в присутствии 0.2% ацетата натрия при 28°C и освещении лампами накаливания (~50 Вт $м^{-2}$).

Получение экстрактов клеток и очистка гидрогеназы. Для получения бесклеточных экстрактов клетки, отобранные в конце экспоненциальной фазы роста, отделяли от культуральной жидкости на проточной центрифуге. Выделение гидрогеназы проводили как описано ранее [8]. В процедуру выделения входило разрушение клеток, обработка ацетоном, фракционирование сульфатом аммония, жидкостная хроматография на колонках с фенилсефарозой CL-4B и ДЭАЭ-целлюлозой DE52, а также препаративный электрофорез.

Определение гидрогеназной активности. Активность гидрогеназы определяли по реакции восстановления окисленного метилвиологена водородом в кювете Тунберга спектрофотометрическим методом [8]. Реакционная смесь (общий объем 2 мл) содержала: 50 мМ Трис-HCl буфер, pH 9.0, 4 мМ метилвиологен и 1–10 мкг гидрогеназы. Кювету заполняли водородом, иногда для инициирования реакции добавляли следовые количества (5–10 мкл) 20 мМ раствора дитионита натрия, приготовленного в анаэробных условиях. Все измерения активности фермента проводили при температуре 30°C. Для расчета активности использовали коэффициент экстинкции восстановленного метилвиологена ε_{600} = 13.00 $мМ^{-1} \cdot см^{-1}$.

Ферментативную активность выражали в мкмоль H_2/мин на 1 мг белка.

Активность гидрогеназы в реакции изотопного обмена водорода в системе H_2/D_2O регистрировали на изотопном масс-спектрометре Delta V Advantage (“Thermo Fisher”, Германия) по образованию HD. Реакцию проводили в сосуде объемом 14 мл, содержащем 1 мл жидкой фазы – 0.8 мл 50 мМ K-фосфатного буфера, pH 7.0, 0.2 мл D_2O и 10 мкл 20 мМ раствора дитионита натрия. Газовая фаза содержала 2% H_2 в гелии. Сосуд был соединен с масс-спектрометром отрезком вакуумного шланга с двумя стопорами. Отрезок шланга между стопорами служил пробоотборником. Реакцию проводили при комнатной температуре (22°C), начинали введением в сосуд 2 мкг гидрогеназы. Каждые 3 мин отбирали пробу (300 мкл) газовой фазы и вводили в масс-спектрометр, измеряя сигнал HD. В качестве контроля служил такой же сосуд с D_2O и всеми компонентами реакционной смеси и газовой фазы за исключением гидрогеназы.

Ингибирование гидрогеназы цианидом и реконструкция FeS-кластеров. Для обработки гидрогеназы ингибитором использовали свежеприготовленный раствор 1.0 М KCN, который добавляли до концентрации 50 мМ. Инкубацию фермента с ингибитором проводили, при комнатной температуре до достижения ~95% падения активности, аналогично описанному ранее [8]. Фермент отмывали от цианида трехкратно 20 мМ K-фосфатным буфером, pH 7.0, с использованием микроконцентраторов Amicon “Microcon-10” (“Merk”, международная группа компаний, зарегистрирована и в России https://www.merckgroup.com/ru-ru). Далее измеряли остаточную активность гидрогеназы и проводили реконструкцию FeS-кластеров согласно методу, аналогичному описанному ранее [11] со следующими особенностями. К раствору фермента в анаэробных условиях добавляли бета-меркаптоэтанол до концентрации 0.5%. Через 10 мин добавляли раствор 30 мМ $FeCl_3$ в воде до концентрации 0.15 мМ. Через 5 мин после добавления $FeCl_3$ добавляли 30 мМ раствор Na_2S в воде до концентрации 0.15 мМ. Смесь фермента с добавками инкубировали при комнатной температуре и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты раствора (5 мкл) для определения гидрогеназной активности.

Регистрация спектров поглощения препаратов гидрогеназы. Для контроля разрушения и восстановления FeS-кластеров регистрировали спектры поглощения до и после обработки препаратов гидрогеназы цианидом, а также после инкубации в растворе для реконструкции. Спектры поглощения образцов гидрогеназы в области 350–600 нм измеряли на спектрофотометре “Shimadzu 1600” (Япония) при комнатной температуре.

Статистический и регрессионный анализ проводили с помощью SigmaPlot 12.0. Данные по H/D изотопному обмену усредняли по 150 точкам (скользящий временной интервал 15 с), остальные эксперименты проводили 3–8 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Использование различных ингибиторов широко применяется в энзимологии для изучения механизма действия и структуры ферментов. Цианид является одним из специфичных ингибиторов металлоферментов, включая гидрогеназу. Действие цианида на гидрогеназы имеет сложный характер. Ранее было показано, что цианид ингибирует очищенную гидрогеназу из *Azotobacter vinelandii* [12]. При этом ингибирование наблюдалось лишь когда фермент был в окисленном состоянии. В восстановленном состоянии гидрогеназа не ингибировалась цианидом. Позднее было обнаружено, что цианид быстро реагирует с гидрогеназами Hyd1 и Hyd2 из *Escherichia coli* [13], если они находятся в окисленном состоянии. Согласно предложенному механизму ингибирования цианид действует как сильный промотор формирования неактивного состояния Ni-B активного центра ферментов. При этом ингибирование снималось восстановлением гидрогеназ.

Недавно было обнаружено, что при длительном (часы) воздействии этого соединения на HydSL гидрогеназу *T. roseopersicina* происходит специфичное разрушение FeS-кластеров [8]. После 20 ч инкубации с цианидом остаточная активность гидрогеназы в реакции поглощения водорода с метилвиологеном в качестве акцептора электронов не проявлялась. При этом, согласно результатам ИК-Фурье спектроскопии, CO и CN лиганды в активном центре гидрогеназы сохранялись. Процесс переноса электронов по цепи внутримолекулярных кластеров необходим в случае взаимодействия фермента с акцептором электронов в реакции поглощения водорода или с донором электронов в реакции выделения водорода. Для активации молекулы водорода гидрогеназой перенос электронов через FeS кластеры не требуется [4], причем такая активация может быть обнаружена по реакции обмена в системе H_2/D_2O или D_2/H_2O. Ранее было показано, что HydSL гидрогеназа *T. roseopersicina* может катализировать реакции изотопного обмена в системе H_2/D_2O или D_2/H_2O [14]. Таким образом, можно предполагать, что гидрогеназа после ингибирования цианидом может осуществлять дейтериевый обмен.

Для проверки этого предположения нативную гидрогеназу и гидрогеназу после ее обработки цианидом инкубировали в растворе D_2O в присутствии H_2, как описано в Методах исследования с

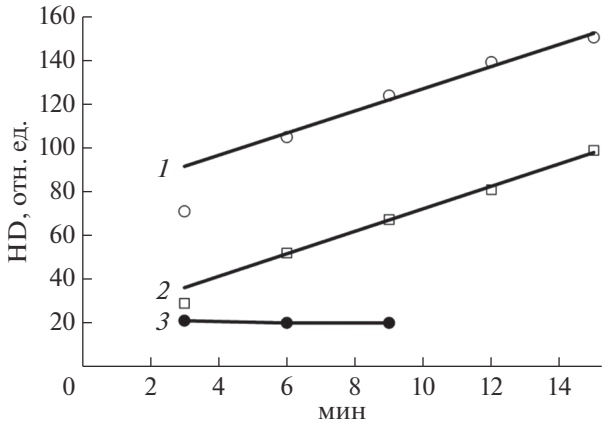


Рис. 2. Изменение содержания HD в газовой фазе в присутствии нативной гидрогеназы (*1*), гидрогеназы после инкубации с 50 мМ цианидом калия в течение 24 ч (*2*), а также в отсутствие фермента (*3*).

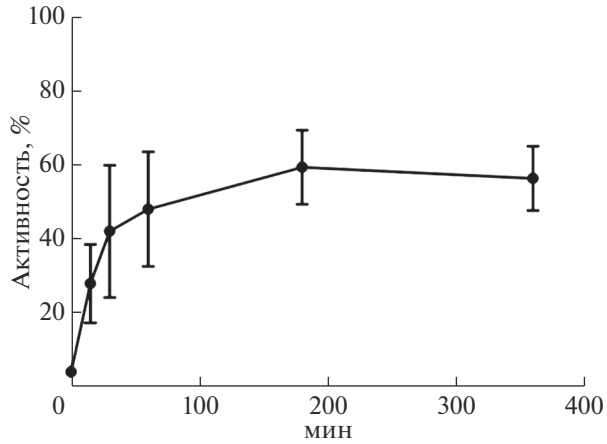


Рис. 3. Процесс восстановления активности гидрогеназы, инактивированной цианидом, в реакции поглощения водорода в присутствии восстановленного метилвиологена, 0.5% бета-меркаптоэтанола, 0.15 мМ $FeCl_3$ и 0.15 мМ Na_2S при комнатной температуре.

периодическим анализом содержания HD в газовой фазе (рис. 2).

Обнаружено, что в сосудах с нативной (рис. 2, *1*) и обработанной цианидом гидрогеназой (рис. 2, *2*) содержание HD в газовой фазе возрастало. В то же время в сосуде без гидрогеназы содержание HD в газовой фазе не увеличивалось (рис. 2, *3*). Аппроксимацию накопления HD проводили в соответствии с уравнением $HD = HD_0 + Vt$, где HD_0 – концентрация HD в нулевой момент времени, V – скорость накопления HD в газовой фазе, t – время. При этом учитывали 4 точки, поскольку первая точка имела заниженное значение вследствие лаг-периода, обусловленного активацией гидрогеназ и диффузионными процессами перехода HD из жидкости в газ. Согласно полученным данным (табл. 1) скорости изменения содержания HD в газовой фазе для нативной и обработанной цианидом гидрогеназ совпадали при высоких коэффициентах корреляции экспериментальных данных и результатов аппроксимации. Таким образом, после обработки цианидом активный центр гидрогеназы не только не терял

Таблица 1. Результаты аппроксимации накопления HD в присутствии нативной и обработанной цианидом гидрогеназ (рис. 2)

Параметр уравнения	Нативная гидрогеназа	Гидрогеназа после обработки цианидом
Коэффициент корреляции, R	0.9937	0.9985
HD_0, отн. ед	76.49 ± 4.47	20.68 ± 2.19
V	5.07 ± 0.406	5.15 ± 0.199

CO и CN лигандов, но и полностью сохранял свою активность.

В литературе описаны попытки восстановления нативной структуры белков после разрушения FeS-кластеров. В одной из первых публикаций описана реконструкция клостридиального ферредоксина из его апобелка, которая приводила к восстановлению 78% исходной активности [9]. В работах по восстановлению структуры кластера F_B фотосистемы I, разрушенного при действии соединений ртути, использовали разные комбинации бета-меркаптоэтанола, $FeCl_3$ и сульфида в анаэробных условиях. Авторами показано практически полное восстановление F_B кластера [11, 15, 16].

Для восстановления структуры мы также использовали добавление бета-меркаптоэтанола, в качестве восстановителя SH-групп цистеина, $FeCl_3$ и Na_2S в качестве структурных элементов FeS-кластеров, однако добавляли их последовательно с промежуточной инкубацией перед каждой следующей добавкой, как описано в Методах исследования. Их совместное действие приводило к восстановлению 60% активности гидрогеназы в реакции поглощения водорода в присутствии восстановленного метилвиологена уже через 30 мин после добавления последнего компонента (рис. 3).

Важно отметить, что в аэробных условиях восстановления гидрогеназной активности не происходило. Как показано в таблице 2 добавление всех этих соединений необходимо для достижения максимальной активности HydSL гидрогеназы *T. roseopersicina* после ингибирования цианидом. Замена $FeCl_3$ на $FeSO_4$ также приводила к восстановлению гидрогеназной активности, но

Таблица 2. Влияние различных добавок на восстановление активности гидрогеназы после ингибирования цианидом

Реакционная система	Активность, %	Доверительный интервал
Гидрогеназа нативная	100	–
Гидрогеназа + KCN	4	2
Гидрогеназа (после ингибирования KCN) + бета-меркаптоэтанол	4	2
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + $FeCl_3$	6	2
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + Na_2S	4	3
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + $FeCl_3$ + Na_2S	60	8
Гидрогеназа + бета-меркаптоэтанол + $FeSO_4$ + Na_2S	20	5

до меньшего значения (табл. 2). Замена бета-меркаптоэтанола на дитиотрейтол или восстановленный L-цистеин, а также изменение условий инкубации (порядок добавления и время инкубации между добавками восстановителя, железа и сульфида) не приводили к повышению эффективности восстановления активности гидрогеназы (данные не приведены). При более длительной инкубации происходило снижение наблюдаемой активности.

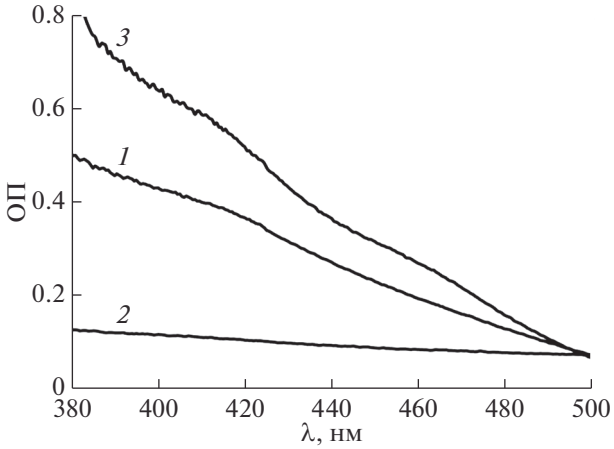
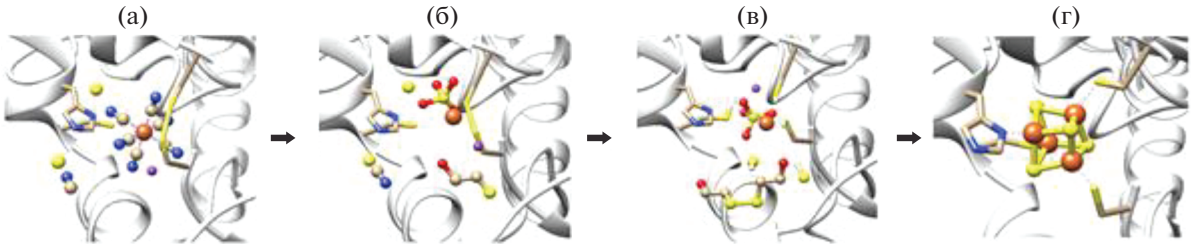


Рис. 4. Спектры поглощения нативной гидрогеназы (*1*), после обработки цианидом и отмывки (*2*) и после инкубации с бета-меркаптоэтанолом, $FeCl_3$ и Na_2S (*3*).

Для подтверждения восстановления структуры FeS кластеров проводили запись оптических спектров нативной гидрогеназы, после ее обработки цианидом и после реконструкции в диапазоне 380–500 нм (рис. 4). Известно, что FeS кластеры поглощают в области 415–422 нм. Нативная гидрогеназа также имеет поглощение в этой области спектра (рис. 4, *1*). После обработки цианидом это поглощение исчезало (рис. 4, *2*), а после реконструкции поглощение в этой области снова проявлялось (рис. 4, *3*).

Механизм восстановления FeS кластеров можно наглядно представить на рис. 5 для 4Fe4S кластера.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что активный железоникелевый центр HydSL гидрогеназы не разрушается под действием цианида. Инкубация обработанной цианидом гидрогеназы с бета-меркаптоэтанолом, $FeCl_3$ и Na_2S приводила не только к восстановлению 60% активности, но и реконструкции железосерных кластеров. Такая реконструкция может быть полезной при изучении железосерных кластеров гидрогеназ. Например, замена при реконструкции ^{56}Fe на ^{57}Fe позволит в дальнейшем определить какие кластеры подвержены разрушению в наи-



$$4Na_2S + 4FeSO_4 + 4HSC_2H_4OH \rightarrow (4HSC_2H_4OH)_2 + 4Na_2SO_4 + [4Fe4S]$$

Рис. 5. Гипотетическая схема реконструкции 4Fe4S кластера после разрушения цианидом. (а) – разрушенный 4Fe4S кластер; (б) – присутствие бета-меркаптоэтанола; (в) – разрыв дисульфидных связей; (г) – реконструкция кластера.

большей степени, а также изучать редокс состояния кластеров при переносе электрона с помощью мессбауэровской спектроскопии или ядерно-резонансной колебательной спектроскопии.

Исследование поддержано грантом РНФ 19-14-00255.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vignais P., Billoud B.* //Chem. Rev. 2007. V. 107. № 6. P. 4206–4272.
2. *Lubitz W., Ogata H., Rüdiger O., Reijerse E.* // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 8. P. 4081–4148.
3. *Greening C., Biswas A., Carere C.R., Jackson C.J., Taylor M.C., Stott M.B., Cook G.M., Morales S.E.* //The ISME J. 2016. V. 10. № 3. P. 761–77.
4. *Shafaat H.S., Rudiger O., Ogata H., Lubitz W.* //Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1827. № 8–9. P. 986–1002.
5. *Гоготов И.Н., Задворный О.А., Зорин Н.А., Серебрякова Л.Т. // Фотосинтезирующие микроорганизмы. / Ред. В.Ф. Гальченко*. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, 2010. Т. 15: М.: МАКС Пресс, С. 260–289.
6. *Pandelia M.E., Nitschke W., Infossi P., Giudici-Orticoni M.T., Bill E., Lubitz W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 15. P. 6097–102.
7. *Lauterbach L., Wang H.X., Horch M., Gee L.B., Yoda Y., Tanaka Y., Zebger I., Lenz O., Cramer S.P.* // Chem Sci. 2015. V. 6. № 2. P. 1055–60.
8. *Zorin N.A., Zabelin A.A., Shkuropatov A.Ya., Tsygankov A.A.* // J. Inorganic Biochemistry. 2017. V. 177. № 1. P. 190–197.
9. *Malkin R., Rabinowitz J.C.* //Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966. V. 23. № 3. P. 822–827.
10. *Зорин Н.А., Стародубов А.С., Цыганков А.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 135–140.
11. *Parret K.G., Mehari T., Golbeck J.H.* //Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1015. № 2. P. 341–352.
12. *Seefeldt L.C., Arp D.J.* // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 6. P. 3298–3303.
13. *Hexter S.V., Chung M.-W., Vincent K.A., Armstrong F.A.* // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. № 29. P. 10470–10477.
14. *Zorin N.A., Dimon B., Gagnon J., Gaillard J., Carrier P., Vignais P.V.* // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. № 4. P. 675–681.
15. *Jung Y.-S., Yu L., Golbeck H.* //Photosynthesis Research. 1995. V. 46. № 1. P. 249–255.
16. *Mehari T., Parret K.G., Warren P.V., Golbeck J.H.* // Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics. 1991. V. 1056. № 1. P. 139–148.

Reconstruction of Cyanide Treated HydSL Hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*

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

[a] *Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

**e-mail: ttt@issp.serpukhov.su*

^{57}Fe-Mossbauer spectroscopy plays a pivotal role in FeS clusters redox state analysis. For ^{57}Fe incorporation it is added to bacterial growth media, which requires quite a lot of the isotope. This work aims at investigation of HydSL hydrogenase NiFe active site functional activity and identification of conditions for FeS cluster reconstruction after long-term cyanide treatment. It is known that prolonged *Thiocapsa roseopersicina* HydSL hydrogenase cyanide treatment destroys FeS clusters. As a result, the catalytic activity of hydrogenase in the reaction of hydrogen uptake in the presence of methylviologen vanishes. However, we demonstrate here that after cyanide treatment the hydrogenase catalytic center remains functionally active. It is found that incubation of cyanide-treated hydrogenase with beta-mercaptoethanol, $FeCl_3$, and Na_2S leads to restoration of hydrogenase activity in the reaction of H_2 uptake with methylviologen. The extent of restoration was time dependent. Maximum hydrogenase activity (60%) was observed after 30 min room temperature incubation. Concurrently, the absorption band at 420 nm present in the native hydrogenase and absent after cyanide treatment, re-appeared, suggesting the reconstruction of the FeS. Thus, instead of growing bacteria in presence of ^{57}Fe isotope, the substitution can be arranged directly in the purified enzyme, allowing to spend less ^{57}Fe.

Keywords: hydrogenase, hydrogen, HD isotope exchange, NiFe active center, FeS clusters, enzyme reconstruction

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 251–261

УДК 582.286.292

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ШТАММА *Xanthomonas campestris* M 28– ПРОДУЦЕНТА КСАНТАНА, ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМА, УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДА

© 2021 г. В. В. Ревин[1], Е. В. Лияськина[1, *], Б. В. Покидько[2], Н. В. Пименов[3], А. В. Марданов[3], Н. В. Равин[3]

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

[2]*Российский технологический университет, Москва, 119571 Россия*

[3]*Институт биоинженерии Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академиии наук, Москва, 117312 Россия*

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

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.
После доработки 15.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Получен новый высокопродуктивный штамм – продуцент ксантана *Xanthomonas campestris* M 28, образующий до 28 г/л полисахарида на среде с мелассой, что почти в два раза превышало продуктивность штамма NRRL B-1459. Проведено полногеномное секвенирование штамма с использованием метода Illumina и нанопорового секвенирования. Геном *X. campestris* M 28 содержал одну хромосому длиной 5102828 нуклеотидов со средним содержанием G + C 65.03%. Изучены структура, физико-химические и реологические свойства полученного ксантана. Установлено, что добавление ксантана в дисперсии бентонита приводило к образованию первичных глинистых частиц (70 нм) и агрегатов ~190 нм без образования осадка. Это свидетельствовало о взаимодействии макромолекул с частицами и агрегатами с формированием полимерглинистых мостиковых структур, обеспечивая стабильность глинистых дисперсий и позволяя достичь необходимых реологических свойств буровых растворов на ксантане, полученном на среде с мелассой, тем самым снижая его себестоимость.

Ключевые слова: ксантан, штамм-продуцент, *Xanthomonas*, бентонит

DOI: 10.31857/S0555109921030107

Ксантан – биополимер, который благодаря своим ценным и уникальным свойствам нашёл применение в пищевой, нефтяной, фармацевтической, горнодобывающей, текстильной и других отраслях промышленности [1–6]. Этот полимер экологически безопасен, нетоксичен, используется в пищевой промышленности как стабилизатор и загуститель под названием E 415. В последнее время ксантан привлекает особое внимание исследователей в связи с перспективами его использования в тканевой инженерии, для получения биокомпозитов с регенеративными и антибактериальными свойствами [6–10].

Особое значение ксантан имеет в нефтегазодобыче при горизонтальном бурении в качестве добавки, улучающей реологию и фильтрационные характеристики буровых растворов на основе бентонита. Одно из важных свойств ксантана – это стойкость его водных растворов к добавкам электролитов. По отношению к бентонитам (частицы и агрегаты минерала монтмориллонита) полисахарид выполняет важную функцию – предотвращает коагуляцию частиц с образованием компактных агрегатов, выпадающих в осадок, а также структурообразующую функцию, способствующую образованию в водных средах тиксотропных гелей с уникальными реологическими и технологическими свойствами [11].

В настоящее время производство микробных полисахаридов типа ксантанов на территории России отсутствует, при этом осуществляются крупнотоннажные закупки китайского сырья различного качества, несмотря на то, что композиции с ксантаном затрагивают такие важные стратегические области народного хозяйства, как строительство, лакокрасочная промышленность, нефте-газовый комплекс, производство товаров бытовой

химии и косметики, а также препаратов медицинского назначения и др.

Для промышленного получения ксантана необходимы, в первую очередь, высокоэффективные технологии и высокопродуктивные штаммы бактерий.

Продуценты ксантана – бактерии рода *Xanthomonas* относятся к семейству *Pseudomonaceae*, типу Proteobacteria, классу Альфа-протеобактерии. Род *Xanthomonas* включает такие виды, как *X. campestris, X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. fragaria*, *X. gummisudans*, *X. juglandis*, *X. phaseoli*, *X.vasculorium* и др. [6, 12]. В промышленном производстве используется бактерия *Xanthomonas campestris* [13].

Большую роль в интенсификации производства ксантана сыграло применение высокоактивных штаммов продуцентов, полученных с помощью различных методов прикладной генетики и селекции [14]. Полностью описаны геномы штаммов *X. campestris* NRRL B-1459 (ATCC 13951) [15], *X. campestris pv. campestris* B 100 [13, 16], *X. campestris* JX [17], *X. campestris pv. campestris* WHRI 3811 [18]. Показано, что размер хромосом *X. campestris* составляет от 4.8 до 5.1 Mb [15–17]. Содержание ГЦ-оснований в хромосоме *X. campestris* составляет 63.7–65.3% [15–17]. Установлено, что ряд штаммов *X. campestris* имеют плазмиды различных размеров, отвечающие за устойчивость к антибиотикам, металлам и т.д.

Стоимость, реологические свойства и выход ксантана зависят от среды для культивирования штамма [19–21]. Для получения ксантана, чаще всего, используются среды сложного состава, включающие, в основном, 2–4% глюкозы и сахарозы, 0.05–0.1% источников азота, таких как дрожжевой экстракт, пептон, нитрат аммония [3, 4, 22], имеющие достаточно высокую стоимость. Для снижения себестоимости ксантана предложены среды, в состав которых включают различные отходы промышленности и сельского хозяйства [24–30]. Это позволяет решать и экологические проблемы утилизации отходов, оказывающих негативное влияние на состояние окружающей среды [31].

Цель работы – анализ генома и изучение условий культивирования нового штамма *Xanthomonas* sp. M 28 на среде с мелассой для получения ксантана с приемлемыми физико-химическими свойствами и реологическими характеристиками, пригодными для использования в нефтегазодобыче и горизонтальном бурении.

МЕТОДИКА

Объект исследования и источник выделения. В качестве объекта исследования использовали штамм-продуцент ксантана *Xanthomonas campestris* M 28, который был получен селекционным путем из штамма, выделенного из пораженной ткани капусты. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером B-3503D. В качестве контроля использовали штамм ВКМ B-611 (=NRRL B-1459=ATCC 13951).

Условия культивирования. Для поддержания бактерий использовали агаризованную среду с сахарозой следующего состава (г/л): сахароза – 20.0; дрожжевой экстракт – 5.0; пептон – 10.0; агар-агар – 20.0. pH 6.8 – 7.0. Для получения ксантана использовали среду с мелассой следующего состава (г/л): меласса – 45.0 и 90.0; K_2HPO_4 – 3.0, pH среды – 6.8–7.0.

Культивирование осуществляли в конических колбах на 250 мл в 100 мл среды с мелассой. В качестве посевного материала использовали культуру, выращенную на скошенной агаризованной среде. Колбы засевали 10 мл суспензии бактерий, полученной в результате смыва с поверхности агаризованной среды. Инокулят выращивали на шейкере-инкубаторе ES-20/60 “BIOSAN” (Латвия) при 250 об./мин и температуре 28 ± 1°C в течение 1 сут. Полученным инокулятом в количестве 10% от объема среды засевали опытные колбы, которые затем помещали в шейкер-инкубатор ES-20/60 при 250 об./мин на 5 сут. Культивирование осуществляли также в биореакторе BIOSTAT® A PLUS (“Sartorius”, Германия) емкостью 1 л при температуре 28 ± 1°C и, перемешивании со скоростью 300 об./мин с подачей воздуха со скоростью 1 л воздуха/0.8 л среды × мин (степень аэрации 1.25 мин$^{-1}$).

Секвенирование и анализ генома *Xanthomonas* sp M 28. Геномную ДНК выделяли с помощью набора mericon DNA Bacteria Kit (Qiagen, США) по протоколу выделения ДНК у грамотрицательных бактерий. Полученный препарат очищали с помощью набора DNA Clean & Concentrator Kit (“Zymo Research”, Германия). Для определения полного генома штамма M 28 использовали технологии Illumina (“Illumina Inc”, США) и мономолекулярного нанопорового секвенирования (“Oxford Nanopore”, Великобритания). Для приготовления библиотеки геномной ДНК, предназначенной для секвенирования на приборе Illumina, использовали набор реактивов NEBNext ULTRA II DNA Library Prep Kit (“New England Biolabs”, США). Полученную библиотеку секвенировали на Illumina HiSeq2500 с использованием набора MiSeq Reagent Kit V3 (600 циклов). В результате было получено 3.0 млн. пар чтений, суммарная длина которых составила 1.6 млрд нт. Парные пересекающиеся прочтения объединяли с помощью программы FLASH v.1.2.11 [32], последовательности с низким качеством прочтения удаляли с помощью программы Sickle v. 1.33 (https://github.com/najoshi/sickle). Дополнитель-

но геномную ДНК секвенировали на MinION (“Oxford Nanopore”, Великобритания), с использованием набора реактивов Ligation Sequencing kit 1D (SQK-LSK109) согласно протоколу производителя. Было получено 262685 чтений со средней длиной 4458 нт.

Для сборки полной последовательности генома из прочтений, полученных на Illumina и MinION, использовали программу Unicycler v.0.4.8 [33]. Поиск генов и их аннотацию проводили с использованием сервера RAST [34] с последующей проверкой аннотации в результате сравнения последовательностей предсказанных белков с базами данных NCBI. Средние уровни идентичности нуклеотидных последовательностей для полных геномов определяли с помощью программы FastANI [35].

Определение количества ксантана и биомассы. Количество биомассы определяли весовым методом после отделения клеток центрифугированием при 8000 g в течение 40 мин, ксантана – после осаждения экзополисахарида 96%-ным этиловым спиртом в соотношении 1 : 2 по об./об. Ксантан высушивали лиофильно на сушилке Freeze Dryer “Labconco” (США).

Определение сахаров методом ВЭЖХ. Для количественного определения сахаров проводили высокоэффективную жидкостную хроматографию с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20A с рефрактометрическим и УФ-детектором (“Shimadzu”, Япония). Определение сахаров проводили с УФ-детектированием (254 нм) на хроматографической колонке 250 × 4.6 мм Supelcosil LC-NH2 (“Merck”, Германия). Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме при расходе элюента 0.4 мл/мин и температуре термостата колонки 40°C. В качестве подвижной фазы использовали 75%-ный ацетонитрил. Для отделения биомассы культуральную жидкость центрифугировали на высокоскоростной центрифуге “Sorvall RC-6 Plus” (США) при 10000 об./мин в течение 15 мин. Супернатант смешивали с ацетонитрилом в соотношении 1 : 3 и вновь центрифугировали на лабораторной центрифуге “ELMI CM-50” (Латвия) при 10000 об./мин 5 мин.

Спектрофотометрия. Спектрофотометрическое исследование образцов ксантана проводили на инфракрасном спектрометре с преобразованием Фурье IRPrestige-21 (“SHIMADZU”, Япония). ИК-спектры были получены исследованием образцов в таблетках с KBr.

ЯМР ^{13}C спектроскопия. Регистрация твердотельных спектров ЯМР ^{13}C выполнена на спектрометре JEOL JNM-ECX400 (“JEOL”, Япония) (9.39 T, 100.5 МГц) в твердой фазе при комнатной температуре с применением техники кросс-поляризации (CPMAS) со скоростью вращения 10 кГц в 7 мм роторах из диоксида циркония. Магический угол вращения образца (MAS) определяли при скорости вращения 10 кГц. Все MAS эксперименты проводились при комнатной температуре; протонную развязку осуществляли с помощью двойной импульсной модуляцией фазы (TPPM). При регистрации спектров ^{13}C MAS ЯМР использовали роторно-синхронизацию последовательности эха (RSE) или один импульс возбуждения (SP) на ларморовской частоте 100.6 МГц. Для оптимизации процесса регистрации спектра было подобрано время релаксации ядер углерода. Длительность импульса для угла 90° составила 6 мс, а для 180° – 12 мс, общее количество сканов 256. Спектры обрабатывались с помощью программы ACD/NMRProcessorAcademicEdition, Ver. 12.01.

Определение молекулярной массы. Молекулярную массу ксантана определяли методом капиллярной вискозиметрии с использованием капиллярного вискозиметра Оствальда, термостатированного при температуре 25°C. Расчет проводился по уравнению Марка-Хаувинка (1):

$$[\eta] = KM^{\alpha}. \quad (1)$$

Значения констант K и α принимались равными 2.79×10^{-5} и 0.78 соответственно [36].

Исходные растворы полимеров концентрацией 0.5% (масс.) готовили путем растворения навесок полимера в 0.01 М растворе хлорида натрия. Диспергирование осуществляли на магнитной мешалке с применением кратковременной УЗ-обработки, используя ванну UC-7000. Спустя несколько часов, после получения полностью гомогенного прозрачного раствора проводили серию разбавлений 0.01 М NaCl с получением серии разбавленных растворов. Растворы гомогенизировались путем механического перемешивания и выдерживали сутки до проведения измерений.

Определение реологических свойств. В качестве основного компонента буровых растворов использовали бентонитовый глинопорошок Зыряновского месторождения марки ПБМБ (“Бентонит Кургана”, Россия) с содержанием монтмориллонита порядка 60%, активированного 4%-ной кальцинированной содой. В качестве модификаторов использовали коммерческий ксантан MHO–80D (Китай) и ксантан, образуемый *X. campestris* M 28.

Для тестирования влияния ксантановых модификаторов на реологические свойства дисперсий в присутствии солей были изготовлены 6%-ные дисперсии бентонита в холодной водопроводной воде (жесткость порядка 5 мг-экв/л), содержащей 2.5 и 30% хлорида натрия. Изготовление диспер-

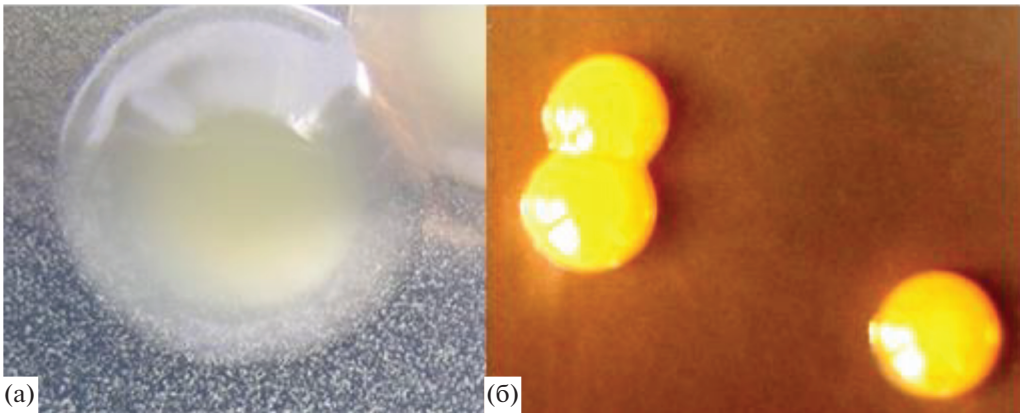


Рис. 1. Колонии *Xanthomonas* sp. M 28 (а) и *X. campestris* ВКМ В-611 (=NRRL B-1459=ATCC 13951) (б) на среде с глюкозой на 3 сут роста.

сий осуществлялось на смесителе Воронеж при 8000 об. в течение 20 мин. После изготовления дисперсии выдерживались в течение 1 ч до наступления равновесия. Было показано, что порядок ввода компонентов (глина/полимер/соль) слабо меняло реологию дисперсий, то есть показатели были в данном случае равновесными. В предварительных экспериментах было показано, что достаточный уровень устойчивости частиц в присутствии соли обеспечивался при содержании ксантана не менее 4% от массы бентонита.

Исследование реологических свойств полимер-бентонитовых дисперсий проводили с помощью ротационного вискозиметра “Fann Instrument Company” (США).

Реологические свойства оценивали, используя уравнение Бингама (2):

$$\tau = \tau_0 + \eta_{пл}\gamma'. \quad (2)$$

Уравнение (2) содержит две константы, характеризующие реологию: предел текучести τ_0 обозначается в реологии буровых растворов как YP (yield point) и характеризует прочность структуры (динамическое напряжение сдвига), показатель пластической вязкости (PV, plastic viscosity) характеризует ньютоновскую составляющую вязкости, то есть реологию системы после ее разрушения под действием высоких сдвиговых напряжений. Во многих случаях этот показатель пропорционален дисперсности частиц или, точнее, объемной доле дисперсной фазы с учетом существования сольватных оболочек. Кроме того для характеристики систем используются показатели эффективной вязкости, в частности параметр AP, (apparent viscosity) при высоких скоростях сдвига (600 об./мин).

Фильтрационные показатели дисперсий (объем фильтрата в мл) оценивали с использованием воронки Бюхнера и колбы Бунзена (диаметр 10 мм) с водоструйным насосом, создающим давление около 1 атм. Для фильтрования применялась стандартная обеззоленная фильтровальная бумага (белая лента). Фильтрацию проводили при постоянном давлении в течение постоянного времени – 5 мин. Указанный способ измерения был соотнесен со стандартным тестом на определение фильтрации (измерения с использованием стандартного фильтр пресса). Для приведения в соответствие с методикой API показателей фильтрации, полученных по лабораторной методике, в независимых опытах был определен коэффициент пересчета (относительная ошибка менее 3%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм продуцент ксантана *Xanthomonas* sp. M 28 был получен селекционным путем из штамма, выделенного из пораженной ткани капусты. Идентификация штамма произведена на основании культурально-морфологических, биохимических и генетических характеристик.

Культурально-морфологические и физиологические свойства. Клетки штамма *Xanthomonas* sp. M 28 грамотрицательные палочки, с закругленными концами, расположенные одиночно и попарно, размеры: 0.4–0.7 × 0.7–2.0 мкм. На агаризованной среде с глюкозой и сахарозой при 28°C на третьи сутки роста штамм *Xanthomonas* sp. M 28 образует слизистые колонии диаметром 5–8 мм, светло-желтого цвета с прозрачной зоной по периферии (рис. 1а). В процессе хранения при температуре 4–9°C размер колоний увеличивался за 7 сут до 20–30 мм. Контрольный штамм ВКМ В-611 (=NRRL B-1459=ATCC 13951) образовывал более мелкие колонии диаметром 2 – 3 мм ярко-желтого цвета (рис. 1б). Известно, что бактерии рода *Xanthomonas* имеют две характерные особенности: образование экзополисахарида ксантана и образование специфических мембраносвязанных

пигментов – ксантомонадинов, что обеспечивает мукоидность и желтую окраску колоний. По сравнению с контрольным штаммом ВКМ В-611 колонии штамма *Xanthomonas* sp. M 28 имели менее интенсивную пигментацию, но значительно более выраженную мукоидность.

Штамм *Xanthomonas* sp. M 28 является аэробным, мезофильным гетеротрофом. Растет в пределах температур 4–37°C с оптимальной температурой для роста 28–30°C и в диапазоне pH 5.0–7.5 с оптимумом при 6.8–7.0. В качестве источников углерода и энергии штамм использует глюкозу, сахарозу, галактозу, мальтозу, раффинозу. Штамм каталазоположительный и оксидазоотрицательный, разжижает желатин, пептонизирует молоко, не восстанавливает нитраты, гидролизует крахмал.

Основные характеристики генома. В результате секвенирования генома *Xanthomonas* sp. M 28 с помощью двух технологий – Illumina и мономолекулярного нанопорового секвенирования, была определена полная последовательность его хромосомы длиной 5102828 нт со средним содержанием G + C 65.03%, плазмиды найдены не были. В результате анализа генома было обнаружено 2 копии оперона генов рибосомной РНК (16S–23S-5S), 55 генов транспортных РНК (тРНК), и 4747 потенциальных белок-кодирующих генов.

Последовательность гена 16S рРНК, идентифицированного в геноме, на 100% идентична последовательностям генов 16S рРНК различных штаммов *Xanthomonas*, отнесеннным к видам *X. campestris*, *X. arboricola*, *X. hortorum* и *X. gardneri*. Поиск в GenBank близких к *Xanthomonas* sp. M 28 полногеномных последовательностей, показал, что ближайшим является геном штамма *X. campestris* pv. *campestris* B1459 (GenBank assembly GCA_001372255.1), со средней идентичностью нуклеотидных последовательностей (**ANI**) 99.87 на 94% длины генома штамма *Xanthomonas* sp. M 28. С другими видами *Xanthomonas* уровень ANI не превышал 90%, причем участки с высокой гомологией последовательностей составляли менее 80% генома *Xanthomonas* sp. M 28. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что *Xanthomonas* sp. M 28 представляет новый штамм *X. campestris* pv. *campestris*.

В результате анализа генома *Xanthomonas campestris* M 28 идентифицирован кластер биосинтеза ксантана, включающий гены *gumA* и оперон *gumB-gumN*. Нуклеотидная последовательность соответствующего участка генома практически идентична (99.86%) ранее описанной для штамма *X. campestris* B1459 (GenBank U22511).

Геном штамма *X. campestris* M28 депонирован в GenBank под номером CP062066 (BioProject PRJNA664929, BioSample SAMN16237388).

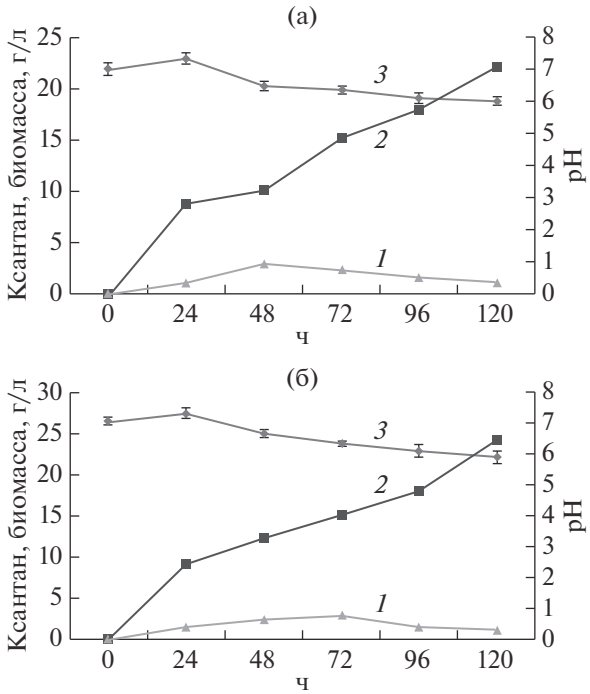


Рис. 2. Динамика образования биомассы (*1*), ксантана (*2*) и изменения pH (*3*) в процессе культивирования *X. campestris* M 28 на среде с мелассой в концентрации 45 (а) и 90 г/л (б).

Образования ксантана штаммом *X. campestris* M 28. Динамика образования ксантана и биомассы штаммом *X. campestris* M 28 изучалась при выращивании в колбах и биореакторе BIOSTAT® A PLUS на среде с мелассой.

Меласса – побочный продукт конечной стадии кристаллизации в процессе производства сахара и один из наиболее экономичных источников углерода в микробиологической промышленности. Меласса содержит около 80% сухих веществ, из которых около 48% представлено сахарозой. Она также богата белками и органическим азотом.

Согласно данным литературы, оптимальной концентрацией сахарозы в среде для штамма *X. campestris* NRRL B-1459 была концентрация 25 г/л [20]. Выход ксантана при этом составлял 15.8 г/л. Штамм *X. campestris* MO-03 образовывал максимальное количество ксантана (20.5 г/л) в среде с мелассой, содержащей сахарозу в концентрации 40 г/л [30].

В настоящей работе исследовали образование ксантана на средах с мелассой в концентрации 45 и 90 г/л с содержанием сахарозы 25 и 50 г/л соответственно. Максимальное количество ксантана образовывалось на 5 сут культивирования и составляло 22.10 ± 0.3 г/л (рис. 2а) и 24.29 ± 0.20 (рис. 2б) на средах с мелассой в концентрации 45 и 90 г/л соответственно.

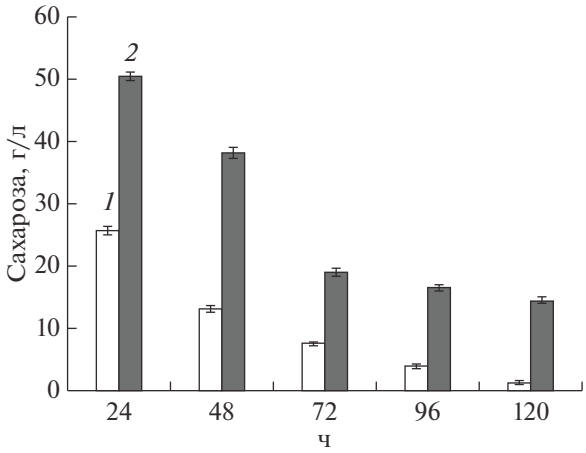


Рис. 3. Изменение концентрации сахарозы в культуральной жидкости в процессе культивирования *X. campestris* M 28 на среде с начальной концентрацией мелассы 45 (*1*) и 90 г/л (*2*) (ВЭЖХ).

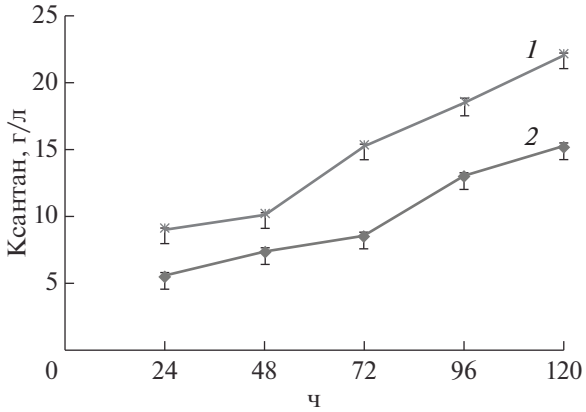


Рис. 4. Динамика образования ксантана штаммами *X. campestris* M 28 (*1*) и *X. campestris* ВКМ B-611 (*2*).

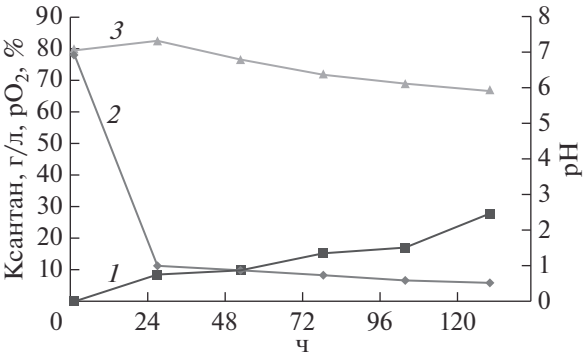


Рис. 5. Образования ксантана (*1*), изменения pO_2 (*2*) и pH (*3*) в процессе культивирования *X. campestris* M 28 в биореакторе (45 г/л мелассы).

Максимальное накопление ксантана совпадало со снижением прироста биомассы бактерий. Наибольшее количество биомассы накапливалось на 48 ч культивирования и составляло 3.01 ± ± 0.08 г/л на среде с мелассой в концентрации 45 г/л. При использовании среды с мелассой в концентрации 90 г/л максимум накопления биомассы наблюдался на 3 сут культивирования.

При изучении динамики изменения pH культуральной жидкости показано, что на первые сутки культивирования наблюдалось незначительное повышение значений pH, вероятно за счет потребления органических кислот, присутствующих в мелассе (молочная, янтарная, глутаровая, яблочная и др.). В дальнейшем наблюдалось снижение значений pH, что, вероятно, обусловлено образованием органических кислот как продуктов неполного окисления углеводов и образования ксантана, являющегося кислым гетерополисахаридом. В целом, значения pH были оптимальными как для роста бактерий, так и для образования ксантана (pH 6.5–7.5).

В процессе культивирования штамма *X. campestris* M 28 проводилось количественное определение сахарозы в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (рис. 3).

Согласно представленным данным, за трое суток культивирования наблюдалось практически полное потребление сахарозы в среде при ее начальной концентрацией 25 г/л. При использовании же среды с содержанием сахарозы 50 г/л, ее значительное количество (14.58 ± 0.49 г/л) оставалось в среде после культивирования бактерий.

Таким образом, в процессе культивирования штамма *X. campestris* M 28 на средах с мелассой в колбах выход ксантана составлял 22–24 г/л, что превышало аналогичные показатели контрольного штамма *X. campestris* ВКМ B-611, образующего полисахарид в концентрации не более 15 г/л на 5 сут культивирования (рис. 4).

На следующем этапе работы была исследована кинетика образования ксантана в биореакторе BIOSTAT® A PLUS объемом 1 л. Максимальное количество ксантана образовывалось штаммом *X. campestris* M 28 при перемешивании со скоростью 300 об./мин и степени аэрации 1.25 мин$^{-1}$ на пятые сутки культивирования и составляло 27.91 ± ± 0.14 г/л (рис. 5). Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым максимальный выход ксантана в биореакторе наблюдался при перемешивании со скоростью 300 об./мин [41].

В первые часы культивирования насыщение кислородом составляло около 80%. Далее количество кислорода снизилось до 10% за первые сутки

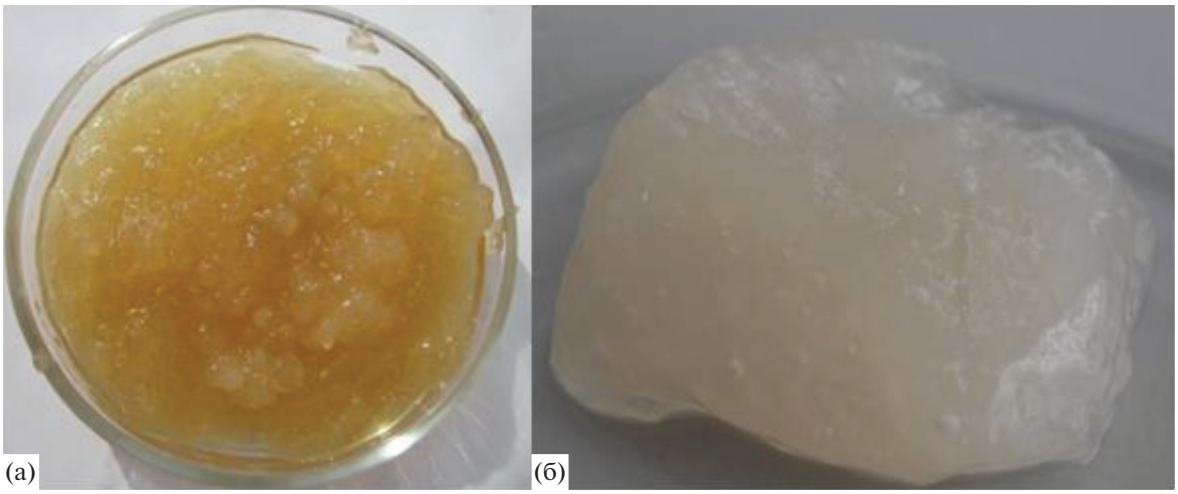


Рис. 6. Ксантан, образуемый *X. campestris* M 28, после выделения (а) и повторного переосаждения (б).

роста, что вероятно связано с увеличением вязкости культуральной жидкости в результате образования ксантана. Также в первые часы культивирования наблюдалось незначительное повышение pH культуральной жидкости, что вероятно связано с потреблением органических кислот, входящих в состав мелассы. В дальнейшем наблюдалось понижение pH культуральной жидкости, что можно объяснить образованием органических кислот как продуктов неполного окисления углеводов и образованием ксантана, который является кислым гетерополисахаридом.

Полученный ксантан после выделения и очистки (рис. 6) получали в порошкообразном виде после лиофильного высушивания.

Изучение физико-химических и реологических свойств ксантана. Исследование ксантана методом ИК-спектроскопии показало сходство инфракрасных спектров ксантана *X. campestris* M 28 и коммерческого ксантана (рис. 7). Присутствие пиранозных колец в образцах ксантана исследуемых штаммов подтверждалось наличием пиков поглощения в области 950–800 см$^{-1}$. Поглощение в области 1050–1100 см$^{-1}$ соответствует асимметричным валентным колебаниям эфирной связи C_1–O–C_4, с одним атомом углерода, входящим в пиранозное кольцо, и вторым атомом, образующим связь с гликозидным гидроксилом или с молекулой углеводорода. Наличие поглощения в области 1800–1500 см$^{-1}$ с хорошо выраженным максимумом при 1640 см$^{-1}$ соответствует валентным колебаниям групп C=O и свидетельствует о том, что в кислых экзополисахаридах, к которым принадлежит ксантан, имеются карбоксильные группы. Для свободных OH-групп характерно поглощение в области больших волновых чисел 3600–3200 см$^{-1}$. При этом поглощение OH-групп, участвующих в образовании водородных связей, смещено в область более низких частот. Максимумы в области 890–900 см$^{-1}$, характерны для деформационных колебаний аксиальной связи C-H у первого атома гексоз, присутствие которых в спектре указывает на наличие β-гликозидных связей.

Молекула ксантана имеет в своем составе главную цепь полимера (a, b) идентичную молекуле целлюлозы и ответвления, представляющие собой трисахарид состоящий из остатков молекул глюкозы (c), маннозы (e), глюкуроновой кислоты (d), а также пируватные и ацетные группы (рис. 8а).

На рис. 8б представлен ^{13}C ЯМР спектр ксантана *X. campestris* M 28. Спектр однозначно дока-

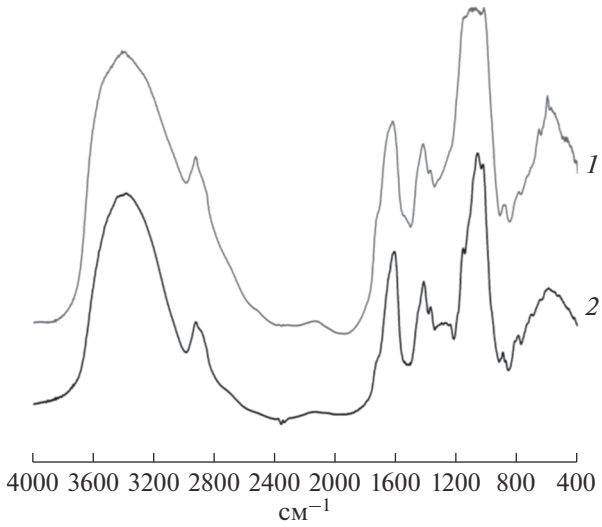


Рис. 7. ИК-спектр ксантана *X. campestris* M 28 (*1*) и коммерческого препарата (*2*).

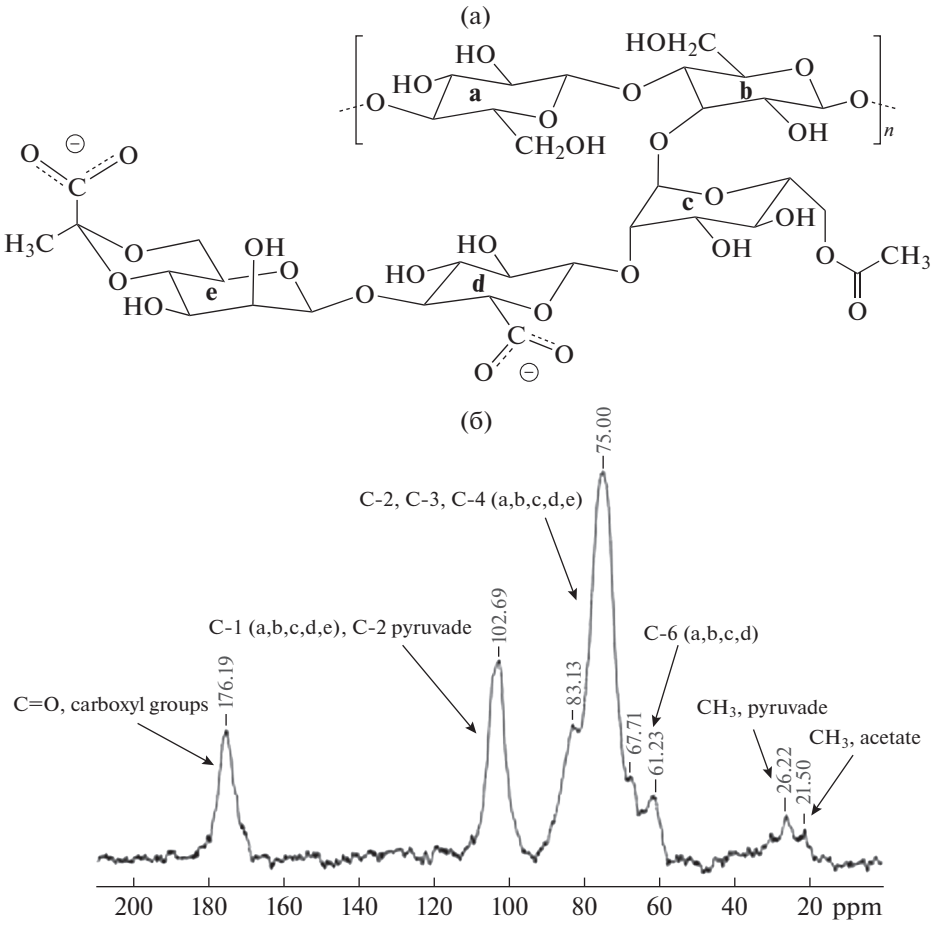


Рис. 8. Структурная формула фрагмента макромолекулы ксантана (а) и ЯМР ^{13}C спектр ксантана *X. campestris* M 28 (б).

зывает наличие карбоксильных групп (COO), остатков пировиноградной и уксусной кислот, фрагментов глюкозы, маннозы и глюкуроновой кислоты.

Таким образом, полученные ИК и ЯМР спектры однозначно свидетельствуют о том, что *X. campestris* M 28 синтезирует микробный полисахарид, полностью совпадающий со структурой ксантана.

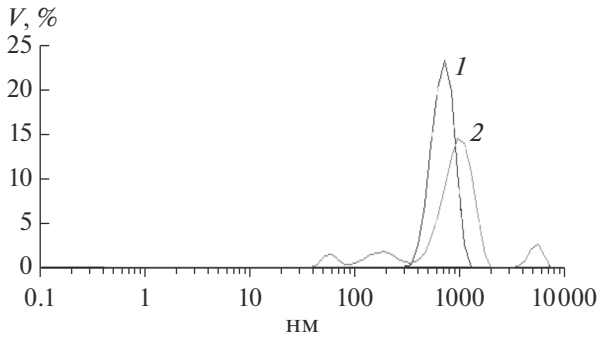


Рис. 9. Дифференциальные кривые распределения частиц по размерам в 0.5%-ных дисперсиях бентонита: *1*–исходный бентонит, *2* – дисперсия бентонита с добавкой ксантана (4% вес. от массы бентонита).

На следующем этапе задачей работы было сравнительное изучение физико-химических и реологических характеристик ксантана *X. campestris* M 28 в сравнении с коммерческим ксантаном.

Для исследуемых полимеров молекулярная масса составила 940000 г/моль для коммерческого ксантана и 530000 г/моль для ксантана *X. campestris* M 28.

На рис. 9 приведены кривые объемного распределения частиц по размерам в разбавленных 0.5%ных дисперсиях бентонита ПБМБ без полимера и в присутствии 4% ксантана, полученные с использованием анализатора размеров частиц Malvern ZetaSizer.

Для исходного бентонита в водной дисперсии характерно наличие агрегатов частиц со средним размером фракции порядка 0.6 мкм. В присутствии ксантана наблюдалось одновременно диспергирование агрегатов до первичных частиц (70 нм) и агрегатов размерами ~190 нм, а также образование

Таблица 1. Основные показатели 6%-ных растворов бентонита, модифицированного ксантаном (4%) при различном содержании хлорида натрия.

Система	2.5% NaCl, ксантан		30% NaCl, ксантан	
	X. campestris M 28	коммерческий	*X. campestris* M 28	коммерческий
YP, Па	2.4	5.9	2.9	6.8
PV, мПа × с	5	8	7.5	19
AV, мПа × с	7.5	14	10.2	26
F, мл	5.9	14.2	4.6	7.2

агломератов или флоккул микронных размеров, без образования осадка, что свидетельствует о взаимодействии макромолекул с частицами и агрегатами с формированием полимер-глинистых мостиковых структур.

В табл. 1 приведены результаты определения реологических и фильтрационных характеристик глинистых дисперсий.

Использование ксантана *X. campestris* M 28 обеспечивало достаточную стабильность глинистых дисперсий. При этом добавки ксантана придавали буровым растворам на глинистой основе уникальную устойчивость к воздействию электролитов, способствуют сохранению реологии растворов при бурении в осложненных условиях, а также в породах сложного состава. В таких системах полимерные молекулы ксантана обеспечивали устойчивость глинистых частиц и агрегатов, сохраняли гелеобразную структуру раствора с необходимым уровнем тиксотропных свойств, высоким уровнем эффективной вязкости, и достаточной прочностью структуры. Это происходило за счет возможной адсорбции макромолекул на поверхности мотмориллонита и образования полимерглинистых мостиковых структур.

Способность ксантана к стабилизации глинистых дисперсий возрастает с ростом молекулярной массы ксантана, в тоже время рост молекулярной массы приводит к снижению скорости растворения полимера, особенно в средах с повышенным содержанием электролита. В этом случае, при снижении стоимости производства ксантана, несмотря на меньшую молекулярную массу продукта, увеличение количества добавляемого ксантана вполне может компенсировать недостаток, связанный с менее высокими значениями молекулярной массы.

Результаты показали, что в глинистых системах достигался стабилизирующий эффект, достаточный для обеспечения высокого уровня эксплуатационных и технологических характеристик, даже при использовании равных масс высокомолекулярного коммерческого ксантана и экспериментального ксантана полученого в работе.

* * *

В связи с широким применением ксантана в различных областях промышленности важным является получение новых высокопродуктивных штаммов, способных продуцировать полисахарид с высоким выходом и необходимыми технологическими свойствами. В настоящей работе получен новый высокоэффективный продуцент ксантана *X. campestris* M 28, образующий до 28 г/л полисахарида на среде с мелассой, что почти в 2 раза превышает продуктивность контрольного штамма *X. campestris* NRRL B-1459. При этом полученный полимер обеспечивал в композиции с бентонитом необходимую реологию бурового раствора, не уступающую по эффективности растворам на основе высокомолекулярных форм ксантана.

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о получении ксантана с физико-химическими свойствами и реологическими характеристиками, пригодными для использования при бурении нефтяных и газовых скважин с использованием высокопродуктивного штамма и побочных продуктов пищевой промышленности для его выращивания, которые могут способствовать снижению производственных затрат.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант FZRS-2020-0003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ревин В.В., Лияськина Е.В.* Биотехнология бактериальных экзополисахаридов. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2019. 192 с.
2. *Mohsin A., Zaman W.Q., Guo M., Ahmed W., Khan I.M., Niazi S., Rehman A., Hang H., Zhuang Y.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 162. P. 43–49. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.008

3. *Habibi H., Khosravi-Darani K.* // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 130–140. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.013
4. *Garcia-Ochoa F., Santos V.E., Casas J.A., Gomez E.* // Biotechnol. Adv. 2000. V. 18. P. 549–579. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00050-1
5. *Jang H.Y., Zhang K., Chon B.H., Choi H.J.* // J. Ind. Eng. Chem. 2015. V. 21. P. 741–745. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.005
6. *Petri D.F.S.* // J. Appl. Polym. Science. 2015. V. 132. P. 42035 https://doi.org/10.1002/app.42035
7. *Kumar A., Rao K.M., Han S.S.* // Carbohydr. Polym. 2018. V. 180. P. 128–144. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.009
8. *Raschip I.E., Fifere N., Varganici C-D., Dinu M.V.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 156. P. 608–620. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.086
9. *Wang Z., Yang Q., Wang X., Li R., Qiao H., Ma P., Sun Q., Huiru Zhang H.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 153. P. 539–544. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.044
10. *Ćirić A., Medarević Đ., Čalija B., Dobričić V., Mitrić M., Djekic L.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 148. P. 942–955. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.138
11. *Erasov V., Pokidko B., Pletnev M.Y.* // J. Dispers. Sci. Technol. 2019. P. 1–10. https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611445
12. *Rottava I., Batesini G., Silva M.F.* // Carbohydr. Polym. 2009. V. 77. P. 65–71. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.001
13. *Alkhateeb R.S., Vorholter F.J., Ruckert C., Mentzc A., Wibberg D., Hublik G., Niehaus K., Pühler A.* // J. Biotechnol. 2016. V. 225. P. 18–28. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.020
14. *Kamall F., Mehrgan H., Mortazavi S.* // Iran. Biomed. J. 2003. V. 7. № 3. P. 91–98.
15. *Wibberg D., Alkhateeb R.S., Winkler A., Albersmeier A., Schatschneider S., Albaum S., Vorhölter F.-J.* // J. Biotechnol. 2015. V. 204. P. 45–46. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.026
16. *Vorhölter F.-J., Schneiker S., Goesmann A., Krause L., Bekel T., Kaiser O., Pühler A. et al.* // J. Biotechnol. 2008. V. 134. № 1–2. P. 33–45. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.013
17. *Tao F., Wang X., Ma C., Yang C., Tang H., Gai Z., & Xu P.* // J. Bacteriol. 2012. V. 194. № 17. P. 4755–4756. https://doi.org/10.1128/jb.00965-12
18. *Kong C., Horta de Passo V., Fang Z., Yang L., Zhuang M., Zhang Y., Lv H.* // Mol. Plant-Microbe Inter. 2019. V. 32. P. 1571–1573. https://doi.org/10.1094/mpmi-07-19-0177-a
19. *Garcia-Ochoa F., Gomas E.* // Biotechnol. Bioeng. 2005. V. 92. № 6. P. 761–772. https://doi.org/10.1002/bit.20638
20. *Faria S.A., Vieira P.A., Resende M.M.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 156. P. 475–488. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8485-8
21. *Assis D.A, Brandão L.V., de Sousa Costa L.A.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 172. № 5. P. 2769–2785.
22. *Carignatto C.R.R., Oliveira K.S.M., de Lima V.M.G., de Oliva Neto P.* // Ind. J. Microbiol. 2011. V. 51. № 3. P. 283–288. https://doi.org/10.1007/s12088-011-0171-9
23. *Wang Z., Wu J., Gao M.J., Zhu L., Zhan X.-B.* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2017. V. 47. P. 468–472.
24. *Wang Z., J. Wu, L. Zhu, X. Zhan.* // Bioresour. Technol. 2016. V. 211. P. 390–397. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.096
25. *Li P., Li T., Zeng Y.* // Carbohydrate Polymers. 2016. V. 151. P. 684–691. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.017
26. *Niknezhad S.V., Asadollahi M.A., Zamani A., Biria D., Doostmohammadi M.* // Food Sci. Biotechnol. 2015. V. 24. P. 453–460. https://doi.org/10.1007/s10068-015-0060-9
27. *Bhatia S.K., Kumar N., Bhatia R.K.* // 3 Biotech. 2015. V. 5. P. 735–739. https://doi.org/10.1007/s13205-014-0273-2
28. *Da Silva J.A., Cardoso L.G., de Jesus Assis D., Gomes G.V.P., Oliveira M.B.P.P., de Souza C.O., Druzian J.I.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2018. V. 3. P. 750–763. https://doi.org/10.1007/s12010-018-2765-8
29. *Gilani S.L., Najafpour G.D., Heydarzadeh H.D., Zare H.* // Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 2011. V. 17. № 2. P. 179–187. https://doi.org/10.2298/ciceq101030002g
30. *Ozdal M., Başaran Kurbanoglu E.* // Fermentation. 2019. V.5. № 1. P. 9. https://doi.org/10.3390/fermentation5010009
31. *Yang L., Han D.H., Lee B.M., Hur J.* // Chemosphere. 2015. V. 127. P. 222–228. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.028
32. *Magoč T., Salzberg S.L.* // Bioinformatics. 2011. V. 27. 21. P.2957–2963.
33. *Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E.* // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. P. e1005595. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595
34. *Brettin T., Davis J.J., Disz T., Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Xia F.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 8365. https://doi.org/10.1038/srep08365
35. *Jain C., Rodriguez-R.L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S.* // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 5114. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9
36. *Masuelli M.A.* // J. Polym. Biopolym. Phys. Chem. 2014. V. 2. № 2. P. 37–43.
37. *Borges C.D., da Moreira A.S., Vendruscolo C.T., Ayub M.A* // Rev. Argent. Microbiol. 2008. V. 40. № 2. P. 81–85.
38. *Hublik G.* Polymer Science: A Comprehensive Reference. I / Eds. M. Moeller, K. Matyjaszewski, Elsevier Science., 2012. P. 221–229. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.01529-0

Characterization of Novel Xanthan-Producing Bacterial Strain *Xanthomonas campestris* M 28

V. V. Revin[a], E. V. Liyas'kina[a, *], B. V. Pokidko[b], N. V. Pimenov[c], A. V. Mardanov[c], and N. V. Ravin[c]

[a] *Nacional'nyj issledovatel'skij Mordovskij gosudarstvennyj universitet, Saransk, 430005 Russia*

[b] *Tekhnologicheskij universitet, Moscow, 119571 Russia*

[c] *Issledovatel'skij centr biotekhnologii Rossijskoj akademii nauk, Moscow, 117312 Russia*

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

A novel highly efficient producer of xanthan was obtained, forming up to 28 g/L of polysaccharide on a molasses medium, which is almost 2 times higher than the productivity of the control strain *X. campestris* NRRL B-1459. The complete genome of *X. campestris* M28 have been determined using the Illumina technique and nanopore monomolecular sequencing. The genome of *X. campestris* M28 consists of one circular chromosome of 5102828 bp. The G + C content of the chromosome of *X. campestris* M28 averages 65%. The structure, physicochemical and rheological properties of xanthan producing by *X. campestris* M28 were analyzed. It was found that the addition of xanthan in bentonite dispersion leads to the formation of primary clay particles (70 nm) and aggregates with dimensions of approximately 190 nm without precipitation. This indicates the interaction of macromolecules with particles and aggregates that result in the formation of polymer-clay bridge structures, which provides stability to clay dispersions and provides the necessary rheological properties of drilling fluids.

Keywords: xanthan, strain, producer, *Xanthomonas*, bentonite

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 262–269

УДК 60:577.11:577.15

ВЛИЯНИЕ ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЫ НА СВОЙСТВА ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ЖЕЛАТИНА

© 2021 г. Д. А. Кадималиев[1, *], О. В. Парчайкина[1], И. В. Сюсин[1], И. В. Чаиркин[2], А. Н. Малафеев[1], А. А. Девяткин[1], В. В. Ревин[1]

[1]Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Факультет биотехнологии и биологии, Саранск, 430005 Россия

[2]Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: cadimded@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.11.2020 г.
После доработки 18.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Оптимизированы условия получения и исследованы характеристики биоразлагаемых хитозан-желатиновых пленок, сшитых различными микробными трансглутаминазами (трансглутаминаза 1 – содержащая мальтодекстрин, трансглутаминаза 2 – содержащая мальтодекстрин и молочный белок). Свойства пленок зависели как от условий сшивки, так и от вида и соотношения исходного сырья. Гели и пленки, полученные с применением трансглутаминазы 1 имели очень низкие характеристики, по сравнению с пленками, полученными с применением трансглутаминазы 2. Методами инфракрасной спектроскопии, рентгеновской томографии и растровой атомно-силовой электронной микроскопии показано, что трансглутаминаза 2 образует сшивки как между аминогруппами желатина, так и хитозана, улучшая характеристики пленок. Пленки на основе хитозана, желатина и глицерина, сшитые трансглютаминазой 2 имели следующие характеристики: прочность – 15.8 МПа, растяжение – 220.0%, толщина – 73.1 мкм, плотность – 1.9 г/см^3. Биоразлагаемость пленок зависела от состава пленок и составляла от 20 до 30 сут. Полученные пленки могут служить матрицей для получения медицинских материалов, обладающих антибактериальными и ранозаживляющими свойствами.

Ключевые слова: желатин, хитозан, трансглутаминаза, сшивка, полимерные пленки, физико-механические свойства

DOI: 10.31857/S0555109921030041

Создание биоразлагаемых материалов на основе смесей природных полимеров, которые могли бы распадаться в окружающей среде на безвредные для природы вещества, является одной из приоритетных задач современности. Особый интерес вызывают полимеры, полученные из отходов вторичного или возобновляемого сырья, такие как хитин (**ХТ**), желатин (**ЖТ**), молочная сыворотка, дрожжевые отходы, микробные полисахариды, соевый белок. Из них можно получать упаковочные изделия [1], композиционные материалы [2–5], пленки [6–10], которые можно применять в строительстве, сельском хозяйстве, медицине, пищевой и текстильной промышленности [11–14].

ЖТ – продукт переработки коллагена, распространённого в природе белкового вещества, образующего главную составную часть соединительной ткани позвоночных, особенно в коже, оссеине костей и в сухожилиях. По аминокислотному и элементарному составу желатин близок к коллагену.

Хитозан (**ХЗ**) является N-дезацетилированным производным природного полимера хитина, обладающим антибактериальными свойствами. Чем выше степень удаления ацила, тем выше функциональный эффект данного продукта. Молекула ХЗ содержит в себе большое количество свободных аминогрупп, что позволяет ему связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд (свойства катионита) [15].

Трансглутаминаза (КФ 2.3.2.13) представляет собой кальций-зависимый фермент, который катализирует образование ковалентных связей между свободными аминогруппами (свободных, либо из боковых цепей лизина) и гамма-карбоксамидными группами глутамина, способствуя внутри- и межмолекулярному перекрестному сшиванию белковых молекул. Из *Streptoverticillium mobaraense* были получены кальций независимые микробные формы трансглутаминазы (**мТГ-аза**).

В ряде работ показано, что ЖТ, сывороточные белки, ХЗ, пектин в присутствии мТГ-азы образуют вязкие гели, которые можно использовать для получения пленок и полимеров. Причем качество пленок зависит от вида и условий их получения [16–18].

Однако имеющиеся данные очень противоречивы и не до конца объясняют вклад отдельных компонентов на свойства полученных пленок.

Цель работы – изучение влияния соотношения ХЗ и ЖТи мТГ-азы на свойства биоразлагаемых пленок на их основе.

МЕТОДИКА

Для получения биополимерных пленок использовали ХЗ, полученный в лабораторных условиях из хитина панцирей раков. ХТ получали по методу [19, 20]. Наличие аминогрупп и степень дезацетилирования определяли по ИК-спектрам и потенциометрческим титрованием. Потенциометрическое титрование растворов хитозана раствором гидроксида натрия точной концентрации проводили с помощью иономера Seven Compact pH/Ion S220 (“Mettler Toledo AG”, Швейцария). Полученную кривую (зависимость pH раствора от объема титранта) графически обрабатывали и находили объемы титранта (NaOH), соответствующие точкам эквивалентности соляной кислоты и солянокислого хитозана. Степень деацетилирования образца (**СД**) в процентах вычисляли по формуле: СД = 203.2 × 100/[42.0 + 1000 m_0/(CNaOH dVNaOH)], где m_0 – масса хитозана в навеске, г; CNaOH – точная концентрация раствора гидроксида натрия, моль/дм^3; dVNaOH – объѐм раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование аминогрупп, см^3; 203.2; 42.0; 100; 1000 – пересчѐтные коэффициенты. За окончательный результат принимали среднее арифметическое значение результатов 3 параллельных измерений, относительное расхождение между которыми не превышало 2.0%. [21]. Вязкость определяли на приборе Gotech rion viscotester VT-04R (Китай) на приборе Реометр “Haake Mars III” (Германия). Молекулярную массу (**ММ**) образцов, полученных в результате кислотного гидролиза, определяли вискозиметрически. Гидролизованные образцы деацетилировали в стандартных условиях. Стандартное деацетилирование гидролизованных в HCl образцов хитина проводили в 50%-ном растворе NaOH при 100°C.

В работе использовали ЖТ пищевой (10%-ный водный раствор, ГОСТ 11293-89 (NF V59-001-1982), производства “ДТ-холдинг” (Россия).

Препрат фермента мТГ-азы 1* – PROBIND TX (содержащая мальтодекстрин) и мТГазы 2* – REVADA TG 11 (содержащая молочный белок и мальтодекстрин) производства BDF Natural Ingredients, SL. (Испания). Количество вносимой мТГ-азы рассчитывали по количеству белка. Содержание белка в молочной сыворотке и ферменте определяли методом Бредфорда [22].

При получении пленок в раствор из ХЗ, ЖТ и мТГазы в качестве пластификатора добавляли глицерин (**ГЦ,** ГОСТ 6259–75, ISO 2096:1972), “Глицерин.ру”, Россия).

ХЗ (2.0 г) растворяли в 100 мл 2%-ной уксусной кислоты при комнатной температуре. К полученному раствору ХЗ добавляли 10%-ный водный раствор ЖТ в различных соотношениях и смешивали. В смесь добавляли глицерин, а затем водный раствор мТГ-азы с концентрацией по белку от 0.9 до 14 мг/мл, смесь перемешивали на магнитной мешалке при температуре 55°C.

Пленки формировали методом свободного вообще то называется литья растекания на гладкую стеклянную поверхность заданной формы с испарением растворителя в течении 1–2 сут при температуре 24–28°C.

Толщину пленок определяли на приборе CHY-C2 (“Labthink Instruments Co.”, Китай), предел прочности и растяжение на универсальной испытательной машине XLW(PC) (“Labthink Instruments Co.”, Китай), плотность на плотномере H-200L (“Hildebrand Pruf-und Mebtechnik GmbH”, Германия) в соответствии с Международным стандартом [23].

Для исследования структурных изменений в биопленках использовали методы ИК-спектроскопии, компьютерной рентгеновской микротомографии, электронную и сканирующую микроскопию. ИК-спектры снимались в диапазоне 4000–800 см$^{-1}$ на ИК-Фурье спектрометре Shimadzu IRPrestige-21 (“Shimadzu”, Япония). Для удобства идентификации проводили коррекцию базовой линии и проводили нормирование с помощью программы Shimadzu IRsolution (“Shimadzu”, Япония). Компьютерную рентгеновскую микротомографию производили с помощью микротомографа SkyScan-1172 (“SkyScan”, Бельгия). Результаты реконструкции микрофотографий анализировали в прилагаемом комплексе программ: CTan, CTvol, CTvox, CTviewer. Электронную сканирующую микроскопию производили на многофункциональном растровом электронном микроскопе SEM Quanta 200i 3D (“FEI Company”, США-Голландия).

Биоразлагаемость пленки определяли по количеству дней или месяцев необходимых для ее деградации в почве.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Степень дезацетилирования полученного ХЗ составила 78%, молекулярная масса – 170 кДа ±3%.

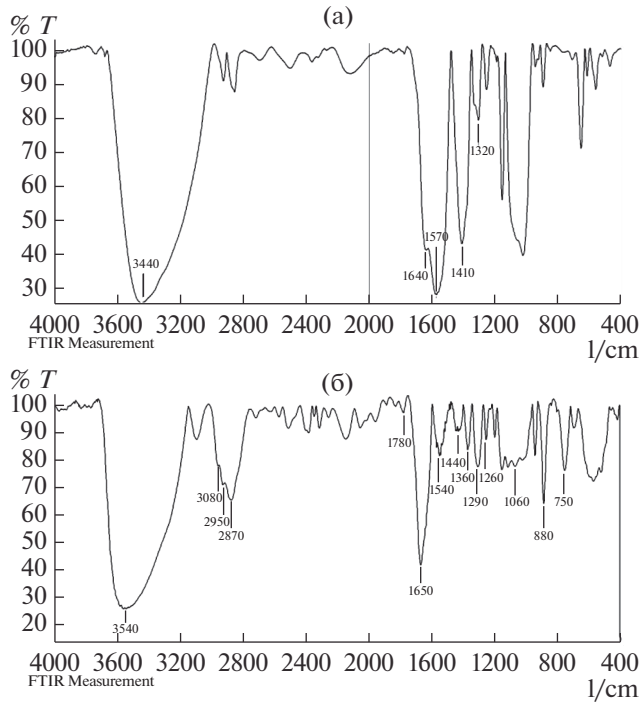


Рис. 1. ИК-спектры ХТ (а) и ХЗ (б).

ИК-спектры ХТ и ХЗ, полученного из ХТ, представлены на рис. 1а, 1б.

В спектре ХТ можно наблюдать характерные полосы при 3600–3200, 1640 см$^{-1}$, обусловленные колебаниями N–H- и O–H-групп, и при 1410 см$^{-1}$ колебаниями -CH_2-группы. В ИК-спектре ХЗ наблюдались характерные полосы поглощения в областях 3600–3300 см$^{-1}$ принадлежащие колебаниям связей O–H и N–H, и 1650 см$^{-1}$, которые свидетельствовали о присутствии NH_2-группы. Деацетилирование ХТ приводило к появлению полосы поглощения при 1440 см$^{-1}$, обусловленное деформационными колебаниями -CH_2- и -CH_3-групп, интенсивность которого свидетельствует о степени деацетилирования. О высокой степени дезацетилирования и наличия NH_2-групп свидетельствовали также интенсивные и четкие полосы поглощения при частотах 1650 и 1540 см$^{-1}$, характерные для амидных групп [24, 25]. По мнению ряда авторов, отношение поглощения в полосе 1650 см$^{-1}$ к поглощению CH-группы при 2870 см$^{-1}$, может служить показателем для оценки степени дезацетилированния ХТ [21, 25–27].

Известно, что эффективность сшивки белков и полисахаридов мТГ-азой зависит как от химической структуры полимеров, так и от вида и условий применения фермента. Например, в ряде работ показано, что мТГ-аза может сшивать различные биополимеры по свободным аминогруппам [28, 29]. На первом этапе исследовали влияние мТГ-азы 1 и 2 на агрегатное состояние ХЗ полученного нами из ХТ в лабораторных условиях.

Добавление мТГ-азы 1 и 2 к ХЗ вызывало образование стеклообразных ломких пластин с включениями. Причем при использовании мТГ-азы 2 образовывался более текучий и гелеобразный сгусток, из которого можно было формировать пленки. Вероятно, это связано с тем, что мТГ-аза 2 содержит молочный белок, придающий эластичность сгустку. Поэтому, для дальнейших исследований использовали мТГ-азу 2. По мнению ряда авторов аминогруппы ХЗ могут выступать в качестве акцептора ацила при сшивке мТГ-азой белок-белок и белок-ХЗ конъюгатов, которые в конечном итоге приводят к увеличению прочности геля [30].

С другой стороны, можно предположить, что наблюдаемый эффект связан с ретикуляцией фермента. Известно, что в присутствии сшивающих агентов, например, глутарового диальдегида в растворе ферментов, ферменты благодаря своей полифункциональности могут выступать в качестве носителей, при этом образуются нерастворимые сетки, в узлах которых находятся ферменты, связанные между собой азометиновыми связями. Такой подход, например, используют при ковалентной сшивке иммобилизованных ферментов. Возможно, в присутствии ХЗ и мТГ-азы 2, фермент выступает также в качестве мостика, при образовании ХЗ конъюгатов.

Известно, что мТГ-аза имеет большее сродство к ЖТ и сывороточным белкам, чем к полисахаридам. Причем, эффективность сшивки белков ферментом зависит от характеристик фермента, его источника, наличия наполнителей, коферментов, стабилизаторов и т.д. Кроме того, белки по сравнению с полисахаридами обладают большей пластичностью и гибкостью, и их наравне с пластификаторами вводят в смеси для получения гибких пленок [27]. В другой работе, показано, что формирование ХЗ-ЖТ полиэлектролитных комплексов может привести к снижению кристалличности системы [31]. Среди других факторов, влияющих на свойства ЖТ-ХЗ пленок можно отметить температуру испарения и наличие пластификаторов (воды и полиолов) [32]. Для улучшения характеристик пленок использовали смеси ХЗ в ЖТ в различных соотношениях, которые обрабатывали ферментом мТГ-азой 2 в различных концентрациях.

Было показано, что в отсутствии фермента полученные пленки были не эластичными, жесткими, с течением времени они становились ломкими, имели низкие значения прочности и растяжения (табл. 1). В присутствии фермента качество полученных пленок улучшалось. Лучшие образцы были получены при соотношении ХЗ-ЖТ 3 : 5. Такие образцы имели следующие показатели:

Таблица 1. Влияние мТГ-азы на физико-механические (Ф-М) показатели пленок на основе ХЗ и ЖТ

Ф-М параметры	Соотношение ХЗ/ЖТ	Концентрация фермента, мг белка/мл					
		0	0.9	1.8	3.5	7.0	14.0
Прочность, МПа	3 : 3	9.2 ± 0.3	11.2 ± 0.4	11.1 ± 0.5	12.8 ± 0.3	12.3 ± 0.7	10.5 ± 0.4
	3 : 5	10.4 ± 0.3	12.1 ± 0.4	13.8 ± 0.4	15.2 ± 0.6	15.8 ± 0.6	15.5 ± 0.7
	3 : 10	11.2 ± 0.4	13.1 ± 0.4	14.1 ± 0.5	14.8 ± 0.6	14.5 ± 0.5	15.1 ± 0.6
Удлинение при растяжение , %	3 : 3	28.1 ± 1.5	59.2 ± 3.2	72.2 ± 4.5	84.7 ± 7.5	134.7 ± 9.5	135.0 ± 9.1
	3 : 5	29.5 ± 1.4	65.1 ± 2.5	78.2 ± 3.8	92.1 ± 4.5	210.1 ± 8.5	195.3 ± 8.1
	3 : 10	34.6 ± 2.1	41.6 ± 2.3	68.2 ± 3.5	73.1 ± 3.8	178.2 ± 8.3	145.3 ± 7.9
Толщина, мкм	3 : 3	65.6 ± 1.5	68.5 ± 1.9	70.6 ± 3.1	73.7 ± 3.0	82.7 ± 3.5	84.1 ± 3.4
	3 : 5	65.8 ± 2.1	62.1 ± 2.5	63.8 ± 2.3	65.2 ± 2.4	73.1 ± 2.9	90.1 ± 3.5
	3 : 10	61.2 ± 1.4	55.4 ± 2.1	65.2 ± 2.5	60.2 ± 1.9	56.3 ± 25.0	100.2 ± 4.1
Плотность, г/см^3	3 : 3	1.52 ± 0.03	1.29 ± 0.02	1.38 ± 0.03	1.37 ± 0.03	1.41 ± 0.04	1.13 ± 0.03
	3 : 5	1.61 ± 0.03	1.48 ± 0.04	1.43 ± 0.03	1.62 ± 0.04	1.91 ± 0.05	1.43 ± 0.03
	3 : 10	1.82 ± 0.04	1.24 ± 0.03	1.56 ± 0.03	1.64 ± 0.04	1.81 ± 0.04	1.42 ± 0.03

прочность – 15.8 МПа, растяжение – 220.0%, толщина – 73.1 мкм, плотность – 1.9 г/см^3 и по этим показателям уступали пленкам из полиэтилена. Дальнейшее увеличение содержания ЖТ снижало способность к растяжению. Для сохранения оптимальных значений прочности и растяжения в дальнейшем использовали соотношение ХЗ-ЖТ 3 : 5. По мнению некоторых авторов ХЗ не влияет на эффективность образования белковых гелей мТГ- азой. Однако эксперименты показали, что мТГ-аза ускоряла процесс образования ХЗ-ЖТ гелей. Причем в опытных образцах количество фермента оказывало незначительное влияние на прочность, плотность и толщину. В то же время существенно улучшало растяжение пленок. При увеличении количества фермента с 7 до 14 мг прочность практически не изменялась. Поэтому использование фермента в количестве более 7 мг по белку было нецелесообразным. В литературе широко дискутируется зависимость физико-механических показателей пленок, полученных из ХЗ и ЖТ, путем сшивки от соотношения компонентов [30]. По-видимому, одной из причин положительного влияния большего содержания ЖТ в исходном сырье является значение pH.

Для сравнения пленки из полиэтилена со сравнимыми плотностью и толщиной имеют следующие характеристики: прочность на разрыв 13.7 МПа, удлинение при растяжении – 190%.

Известно, что оптимум pH микробных мТГ-аз находится в диапазоне 6.0–7.0 [33]. При смешивании используемого нами кислого ХЗ с ЖТ в соотношении 3 : 3 конечное значение pH было 4.8, а при соотношении 3 : 5 – 6.7. Кроме того, экспериментально показано, переход золь-гель уменьшается с увеличением содержания ХЗ. Высокое содержание ХЗ делает более трудным взаимодействие между цепями ЖТ и образованием гелевых сетей [31]. Добавление ХЗ в более высокой концентрации приводит к существенному увеличению модуля вязкости во время охлаждения и препятствует образованию сети белков в результате ХЗ-ЖТ взаимодействий. Хотя в некоторых работах показано, что прочность ХЗ-ЖТ гелей, катализируемых мТГ-азой, незначительно увеличивается с повышением содержания ХЗ [31, 32]. Вероятно, такие противоречивые результаты связаны с разными молекулярными массами используемого ХЗ, так как сшитый гель построен из полимеров (ЖТ и ХЗ) с бимодальными молекулярно-массовым распеределением.

Для обнаружения образования связей между отдельными компонентами при формировании пленок регистрировали ИК-спектры контрольного и лучшего из опытных образцов (рис. 2). Данные сравнительного анализа спектров пленок в ИК-области показали, что в спектрах пленок из ХЗ, ЖТ и ГЦ, в отсутствии мТГ-азы наблюдались характерные полосы поглощения высокой ин-

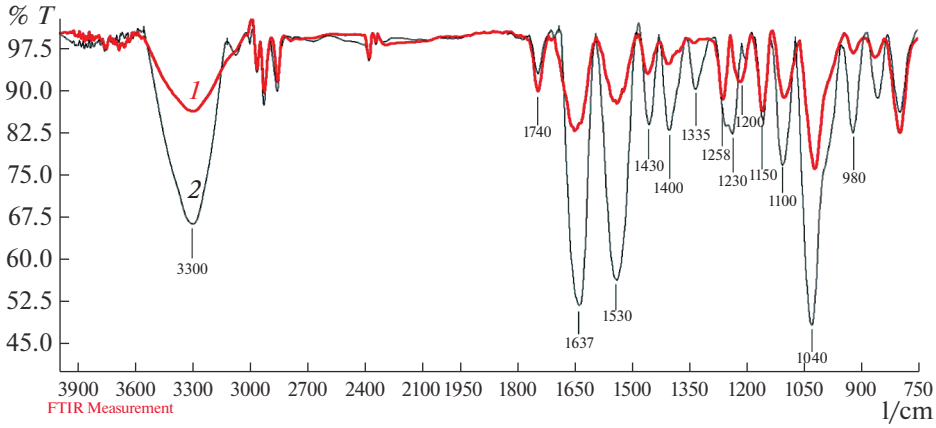


Рис. 2. ИК-спектры пленок состава ХЗ-ЖТ-ГЦ (*2*) и ХЗ-ЖТ-ГЦ-мТГаза (*1*).

тенсивности в диапазоне частот 3500–3300 см$^{-1}$, 1650, 1550 и 1320 см$^{-1}$, которые принято относить к полосам Амид А (NH), I (Co, NH), II (CH_2, NH) и III (CN, NH) в молекулах ЖТ, а также ХЗ с незначительным смещением. Особое внимание заслуживают интенсивные полосы поглощения характерные для аминокислот ЖТ, а именно лизина – в области 1238–1230 см$^{-1}$, и в области 1200–1020 см$^{-1}$ – глутаминовой кислоты, глицина и аргинина, и 1150 см$^{-1}$ – принадлежащей связи C–N в молекулах ХЗ (рис. 6, 7) [32]. В спектрах поглощения исходного ХЗ эти полосы размыты и четко не проявляются (рис. 1б). Когда два или более веществ смешиваются, химические взаимодействия отражаются изменениями в характерных спектрах поглощения этих веществ. При смешивании ХЗ и ЖТ полосы поглощения при 3540 см$^{-1}$ на спектре хитозана, и 1650 и 1560 см$^{-1}$ на спектре ХЗ и ЖТ смещаются, хотя интенсивность поглощения практически не изменяется. Вероятнее всего это связано с взаимодействием между гидроксильными или карбоксильными группами с аминогруппами ХЗ и ЖТ [34, 35]. Известно, что сложный контур полосы Амид I качественно объясняется наложением полос, отвечающих различным конформационным состояниям полипептидной цепи. Клубку соответствует полоса 1656 см$^{-1}$, спирали – 1650 см$^{-1}$, параллельной укладке цепей – 1630 см$^{-1}$, антипараллельной укладке – 1685 см$^{-1}$. Смещение полосы Амид I в низкочастотную область 1636 см$^{-1}$ для гелей с добавками ХЗ по сравнению с чистым гелем ЖТ дает основание полагать, что конформационное состояние макромолекул ЖТ при комплексообразовании с ХЗ меняется в сторону увеличения доли упорядоченных структур. Например, показано, что добавление полисахаридов приводит к увеличению предела текучести и модуля упругости геля ЖТ. Можно полагать, что наблюдаемое возрастание прочности и вязкоупругих свойств гелей связано с изменением конформационного состояния макромолекул ЖТ при формировании межмолекулярных контактов с полисахаридом [36, 37]. В опытном образце в присутствии мТГ-азы даже с учетом того, что мТГ-аза содержит аминогруппы, наблюдалось снижение интенсивности поглощения в области 3500–3300 см$^{-1}$, обусловленные колебаниями амида А (NH) свободных аминогрупп ЖТ. Наблюдалось расщепление и смещение полосы поглощения валентных колебаний N–H-связей в области 1238 см$^{-1}$ характерных для лизина, а в диапазоне 1200–1020 см$^{-1}$ – характерных для аминогрупп алифатических аминокислот – глутаминовой кислоты, глицина, аргинина и лизина, интенсивность поглощения уменьшалась (рис. 2, *1*), что говорит об образовании ковалентных связей между свободными аминогруппами и гамма-карбоксамидными группами глутамина, способствуя сшиванию белковых молекул, в результате действия мТГ-азы. В итоге свободные аминогруппы сменяются связанными. Кроме того, в образование структуры определенный вклад могут вносить взаимодействия между карбоксильными группами ЖТ и аминогруппами ХЗ.

Анализ структурных изменений, происходящих в результате добавления в смесь мТГ-азы методом лазерной томографии и растровой электронной микроскопии показал, что добавление мТГ-азы 2 повышало плотность упаковки и образовывало сшивки между компонентами пленки (рис. 3, 4). На рис. 3а, 3б видно, что в отсутствии фермента пленка менее плотная, чем с ферментом. На фотографиях, полученных в электронном микроскопе, в пленках без фермента четко прослеживалась слоистая структура пленки, в отличии от пленок с ферментом, на которых можно наблюдать более целостную структуру (рис. 4а, 4б).

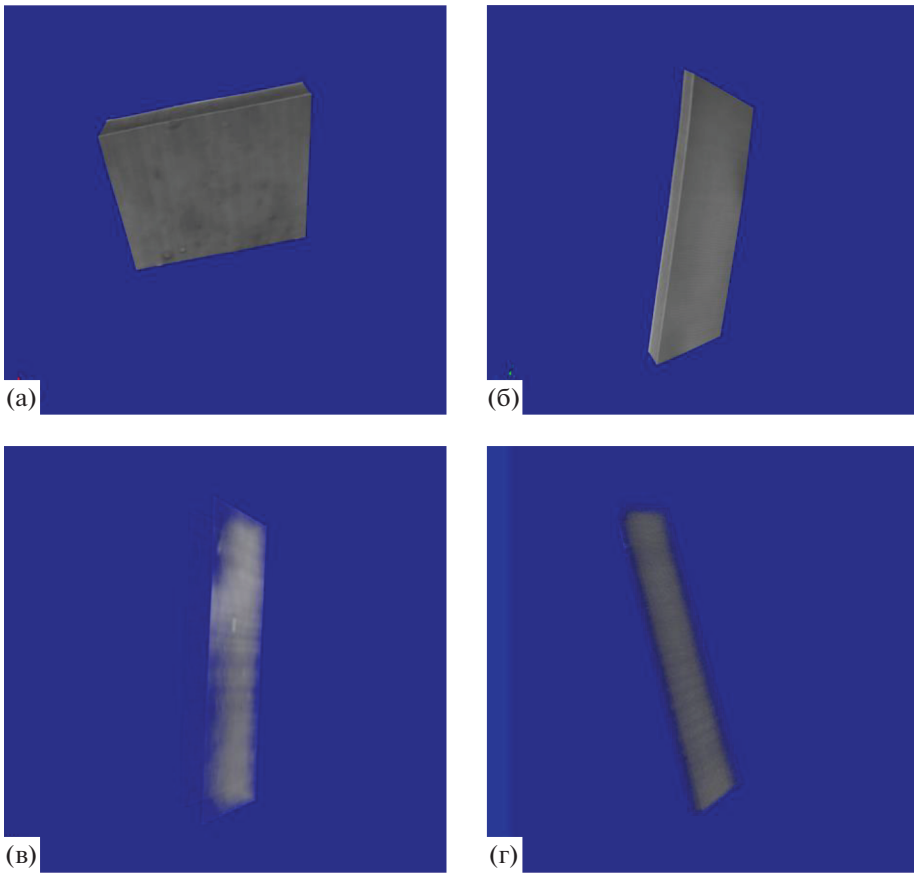


Рис. 3. Рентгено-дифрактометрический анализ контрольных и опытных образцов пленок состава ХЗ-ЖТ-ГЦ (а) и ХЗ-ЖТ-ГЦ-мТГаза (б).

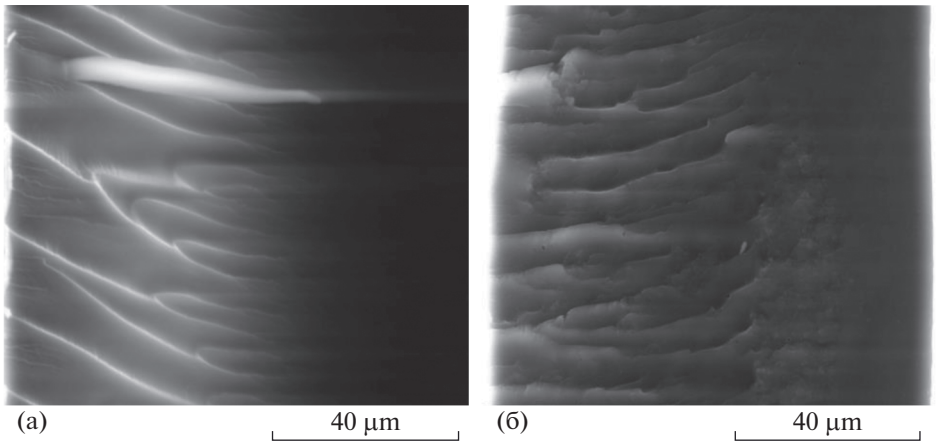


Рис. 4. Растровая электронная микроскопия образцов пленок ХЗ-ЖТ-ГЦ (а) и ХЗ-ЖТ-ГЦ-мТГаза (б).

Для проверки биоразлагаемости полученных пленок проводилась их деструкция в естественных условиях при непосредственном контакте почвы с пленкой. Данные по деструкции пленок представлены на рис. 5. Как видно из представленных рисунков в течении 20–30 сут происходило разложение пленок в естественных условиях.

* * *

В результате проведенных исследований выявлено, что применение трансглютаминазы способствует ускорению гелеобразования смеси хитозан- желатин, из которой можно формировать биоразлагаемые пленки по своим характеристи-

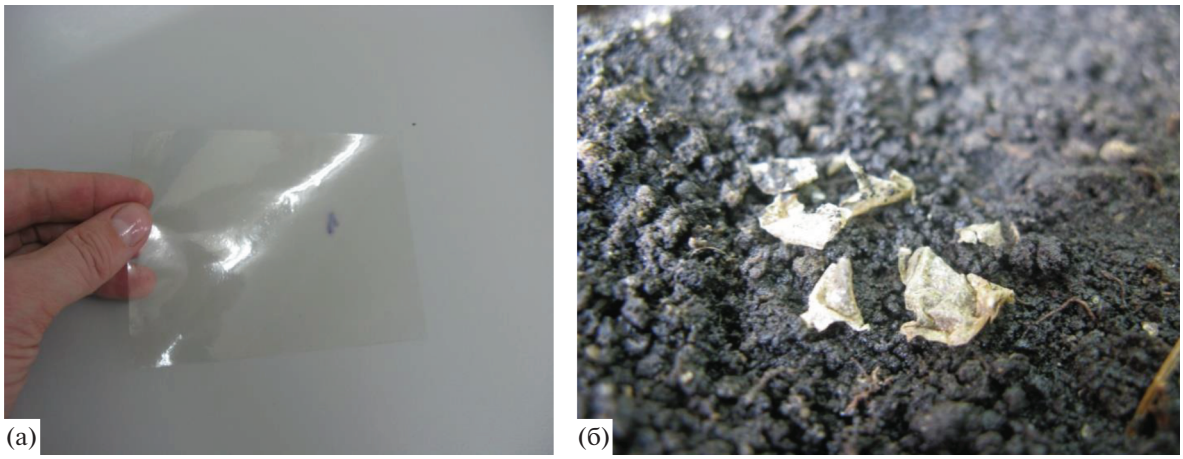


Рис. 5. Исходная пленка (а) и пленка, подвергнутая биоразложению в почве в течение 30 сут (б).

кам не уступающим пленкам из полиэтилена. Полученные пленки можно использовать для изготовления упаковочных материалов и в медицине в качестве матрицы для иммобилизации лекарственных препаратов, обладающих антибактериальными свойствами и регенерирущими свойствами.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (выполнение государственного задания) в рамках научного проекта № FZRS-2020-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Siracusa V., Rocculi P., Romani S., Rosa M.D.* // Trends in Food Science & Technology. 2008. V. 19. P. 634–643.
2. *Kadimaliev D.A., Telyatnik V.I., Revin V.V., Parshin A.A., Allahverdi S., Gunduz G., Kezina E.V., Asik N.* // BioResources. 2012. V. 7. № 2. P. 1984–1993.
3. *Kadimaliev D.A., Kezina E.V., Telyatnik V.I., Revin V.V., Parchaykina O.V., Syusin I.V.* // BioResources. 2015. V. 10. № 1. P. 1644–1656.
4. *Revin V.V., Kadimaliev D.A., Novokuptsev N.* // BioResources. 2016. 11. № 2. P. 3244–3258.
5. *Kadimaliev D.A., Novokuptsev N.V., Abd A.J., Revin V.V., Grunyushkin I.P., Pestov N.A.* // J. Mater. Environ. Sci. 2018. V. 9. № 9. P. 2539–2548.
6. Патент РФ. 2015. № 2545293.
7. *Briassoulis D.* // J. Polym. Environ. 2004. V. 12. P. 65–81.
8. Патент РФ. 2016. № 2604223.
9. Патент РФ. 2020. № 2720099.
10. *Kadimaliev D.A., Kezina E.V.* // J. Biotechnol. 2015. V. 208. P. S 57–S58.
11. *Montgomery R.* // Biores. Technol. 2004. V. 91. P. 1–29.
12. *Yang L., Paulson A.T.* // Food Res. Int. 2000. V. 33. P. 563–570.
13. Патент РФ. 2018. № 2659175.
14. *Громовых Т.И., Садыкова В.С., Луценко С.В., Дмитренок А.С., Фельдман Н.Б., Данильчук Т.Н., Каширин В.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 1. С. 69–75.
15. *Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П.* Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. / Ред. К.Г. Скрябин, Г.А. Вихорева, В.П. Варламов. М.: Наука, 2002. 365 с.
16. *Vera A., Tapia C., Abugoch L.* // Int. J. Biol.Macromol. 2020. V. 144. P. 536–543.
17. *Minh N.P., Nhan N.P.T., Phuong N.T.T., Vinh T.Q., Van Quy T., Binh L.T.* // J. Pharm. Sci. & Res. V. 11. № 4. 2019. P. 1487–1492.
18. *Fernandez J.G., Seetharam S., Ding C., Feliz J., Doherty E., Ingber D.E.* // Tissue Engineering Part A. 2017. V. 23. № 3–4. P. 135–142.
19. Патент РФ. 1997. № 2116314.
20. *Быкова В.М. Немцев С.В.* // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. С. 7–23.
21. *Арзамасцев О.С., Артеменко С.Е., Абдулин В.Ф., Арзамасцев С.В.* // Вестник СГТУ. 2011. № 4(60). Вып. 2. С. 112–114.
22. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
23. ASTM D882-12. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International. West Conshohocken. PA. 2012.
24. *Гартман О.Р., Воробьева В.М.* // Фундаментальные исследования. 2013. № 3. С. 1188–1192.
25. *Кучина Ю.А., Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Сагайдачный В.А., Морозов Н.Н.* // Вестник МГТУ. 2012. Т. 15. № 1. С. 107–113.
26. *Lawrie G., Keen I., Drew B., Chandler-Temple A., Rintoul L., Fredericks P., Grondahl L.* // Biomacromolecules. 2007. V. 8. P. 2533–2541.
27. *Rodrfguez-Nogales J.M.* // Process Biochem. 2006. V. 1. P. 430–437.
28. *Minh N.P., Nhan N.P.T., Phuong N.T.T., Vinh T.Q., Van Quy T.* // J. Pharmaceutical Sciences and Research. 2019. V. 11. № 4. P. 1487–1492.

29. *Fernandez J.G., Seetharam S., Ding C., Feliz J., Doherty E., Ingber D.E.* // Tissue Engineering Part A. 2017. V. 23. № 3–4. P. 135–142.
30. *Benjakul S., Visessanguan W., Phatchrat S., Tanaka M.* // Journal of Food Biochemistry. 2003. V. 27. P. 53–66.
31. *Gomez-Estaca J., Gomez-Gullen M.C., Fernandez-Martin F., Montero P.* // Food hydrocolloids. 2011. V. 25. № 6. P. 1461–1469.
32. *Yampolskaya G.P., Tarasevich B.N., Elenskiy A.A.* // Kolloidnyiy zhurnal. 2005. V. 67. № 3. P. 426–432.
33. *Jun-Hyun O.* // Fish Aquat Sci. 2012. V. 15(1). P. 9–14.
34. *Xu Y.X., Kim K.M., Hanna M.A., Nag D.* // Industrial Crops and Products. 2005. V. 21. P. 185–192.
35. *Meenakshi P., Noorjahan S.E., Rajini R., Venkateswarlu U., Rose C., Sastry T.P.* // Bull. Mater. Sci. 2002. V. 25. P. 25–29.
36. *Маклакова А.А., Воронько Н.Г., Деркач С.Р., Кадырова Г.И., Зотова К.В.* // Вестник МГТУ. 2014. Т. 17. № 1. С. 53–60.
37. *Деркач С.Р., Воронько Н.Г., Маклакова А.А., Кондратюк Ю.В.* // Коллоидный журн. 2014. Т. 76. № 2. С. 164–170.

Effect of Transglutaminase on the Properties of Films Prepared from Chitosan and Gelatin

D. A. Kadimaliev[a, *], O. V. Parchaykina[a], I. V. Syusin[a], I. V. Chairkin[b], A. N. Malafeev[a], A. A. Devyatkin[a], and V. V. Revin[a]

[a] *National Research Ogarev Mordovia State University, Faculty of Biotechnology and Biology, Saransk, 430005 Russia*
[b] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: cadimded@yandex.ru*

The production conditions were optimized and the characteristics of biodegradable chitosan-gelatin films crosslinked with various microbial transglutaminases (transglutaminase 1 – containing maltodextrin and transglutaminase 2 – containing maltodextrin, milk protein) were studied. The properties of the films depended on both the cross-linking conditions and the type and ratio of components in the mixture. Gels and films prepared from chitosan and gelatin with using transglutaminase 1 had very low characteristics, compared to films obtained using transglutaminase 2. Using infrared spectroscopy, X-ray tomography and scanning atomic force electron microscopy it was shown that transglutaminase 2 forms cross-links between both gelatin and chitosan amino groups improving the characteristics of films. Films prepared from chitosan, gelatin and glycerol crosslinked with transglutaminase 2 had the following characteristics: strength-15.8 MPa, tensile strength-220.0%, thickness-73.1 microns, density-1.9 g/cm^3. Biodegradability of the films depended on the its composition and ranged from 20 to 30 days. The resulting films can serve as a matrix for obtaining medical materials with antibacterial and wound-healing properties.

Keywords: gelatin, chitosan, transglutaminase, cross-linking, polymer films, physical and mechanical properties

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 270–273

УДК 577.152.14:541.64

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ГИДРОГЕЛЬ – НОСИТЕЛЬ ПЕРОРАЛЬНОГО ИНСУЛИНА

© 2021 г. Л. И. Валуев[1, *], И. Л. Валуев[1], Л. В. Ванчугова[1], И. В. Обыденнова[1]

[1]Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: valuev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 07.09.2020 г.
После доработки 15.10.2020 г.
Принята к публикации 02.11.2020 г.

Изучено влияние структуры мукоадгезивного инсулинсодержащего полимерного гидрогеля на скорость выделения гормона. Показано, что уменьшение размеров пор гидрогеля приводило к увеличению скорости выделения инсулина, что способствовало сокращению времени достижения положительного эффекта при пероральном введении препарата и сохранении физиологического пути проникновения гормона в кровь через печень.

Ключевые слова: диабет, инсулин, гидрогель полиакриламида

DOI: 10.31857/S0555109921020185

Создание полимерных носителей белков, существенно повышающих их устойчивость к протеолизу и тем самым обеспечивающих возможность перорального введения лекарственных препаратов на их основе относится к одной из наиболее сложных и главное практически значимых проблем современной прикладной биохимии и химии высокомолекулярных соединений.

Среди веществ полипептидной природы самое широкое распространение получил инсулин – гормон, дефицит которого приводит к сахарному диабету. По данным Национального Центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, США) инсулин считается самым изучаемым гормоном: более 300 тысяч цитирований, и только за последний год опубликовано свыше 350 работ, посвященных созданию пероральных форм инсулина.

Причина повышенного внимания к этому гормону заключается в чрезвычайно широком распространении сахарного диабета, получившего название “неинфекционная эпидемия XX и XXI вв.”. В настоящее время по данным ВОЗ в мире около 300 млн человек страдают этим заболеванием, а по прогнозам к 2025 г. количество больных диабетом вырастет до 435 млн.

В естественных условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин попадает в кровь через печень, которая и осуществляет контроль за распределением гормона в организме [1]. При инъекциях (а это практически единственный способ лечения сахарного диабета) такой контроль отсутствует, что может приводить к ряду осложнений, часто наблюдаемых у больных диабетом.

Единственной возможностью подключения печени к распределению инсулина является пероральное введение гормона [2]. Не останавливаясь подробно на существующих подходах к решению проблемы защиты инсулина от действия протеолитических ферментов пищеварительной системы, отметим, что в последние годы основное внимание уделяется защитным системам на основе, так называемых, мукоадгезивных полимеров, обеспечивающих адгезию препарата на слизистую оболочку с последующим его выделением. Дополнительно такие системы обычно содержат ингибиторы протеиназ [3] или соединения, повышающие проницаемость слизистой оболочки для гормона [4]. В качестве полимерной основы используют хитозан и его производные, альгинаты, полилактиды, полиакриламиды, карбоксиметилцеллюлозу, полиакриловую кислоту полиэтиленоксид, и т.д. [5–8].

Следует отметить, что, несмотря на целый ряд положительных результатов испытаний синтезированных препаратов на животных, до настоящего времени не существует реально применяемых в клинических условиях препаратов инсулина для перорального применения.

Весьма обнадеживающие результаты получены при изучении, в том числе и на добровольцах, созданного учеными Российской академии наук под руководством Н.А. Платэ препарата Рансулин [9, 10]. Это инсулин, включенный в полиакриламидной гидрогель, модифицированный овомукоидом, роль которого заключалась к ингибирова-

нию активности ферментов пищеварительной системы (трипсина и α-химотрипсина) и приданию гидрогелю мукоадгезивности. К недостаткам Рансулина следует отнести длительный период времени между приемом препарата и моментом достижения максимального снижения уровня глюкозы в крови.

Цель работы – изучение возможности модификации полиакриламидного гидрогеля – носителя инсулина для увеличения скорости выделения гормона на начальном этапе.

МЕТОДИКА

В работе использовали инсулин (активность 25 ед./мг) фирмы "Novo Nordisk" (Дания), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (**БИС**), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, меркаптоуксусную кислоту (**МУК**) ("Serva", Германия), сывороточный альбумин человека (ММ 67000 Да), алкогольдегидрогеназа из дрожжей (молекулярная масса 141000 Да, "Sigma", США). Овомукоид выделяли из белка яиц утки по методике, описанной в работе [6].

Для получения ненасыщенного производного овомукоида 100 мг овомукоида растворяли в 20 мл 0.5 М бикарбоната аммония, pH 8.0. Раствор охлаждали до 0–5°C, добавляли 0.01 мл хлорангидрида акриловой кислоты и смесь перемешивали в течение 15 мин.

Гидрогель синтезировали путем радикальной полимеризации при комнатной температуре водного раствора, содержащего 0.3% ненасыщенного производного овомукоида, 9.0% акриламида и 0.9% БИС. Реакцию полимеризации проводили под действием окислительно-восстановительного катализатора (персульфата аммония-N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин) в присутствии 0.01–0.12% МУК. Образующийся гидрогель измельчали через сито с диаметром пор 1 мм и промывали 0.5 М бикарбонатом аммония, pH 8.0, до полного удаления не прореагировавших соединений.

Степень набухания гидрогелей оценивали гравиметрически и рассчитывали по формуле: $S_г = m_1/m_2 - 1$, где m_1 и m_2 – массы равновесно набухшего и лиофильно высушенного гидрогеля соответственно.

Для изучения проницаемости к 2 мл геля, набухшего в 0.5 М бикарбонате аммония, pH 8.0, добавляли 4 мл раствора белка в том же буфере. Смесь оставляли при 4°C до установления постоянного значения оптической плотности раствора белка при 280 нм (обычно не более 48 ч). Концентрацию белка в исходном растворе и после его инкубации с гелем оценивали с использованием калибровочной зависимости, построенной для каждого из указанных выше белков. Учитывая соотношения объемов используемых фаз, рассчитывали количество пор, доступных для белка, принимая за 100% их количество, доступных для воды.

Инсулинсодержащие препараты получали насыщением гидрогелей раствором инсулина.

Концентрацию глюкозы в крови кроликов-самцов Шиншилла, массой 2.0–3.1 кг, определяли с помощью глюкометра One Touch ("Johnson & Johnson", США). Концентрацию инсулина в плазме крови и в гомогенизате ткани печени крыс Wistar массой 170–200 г определяли радиоиммунным методом, используя коммерческие наборы РИО-ИНС-ПГ 125 (Республика Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные широкомасштабные испытания Рансулина на трех видах животных (кролики, крысы и мыши) и добровольцах, наряду с отчетливым гипогликемическим действием препарата, выявили одну его особенность, отличающего его от инъекционно вводимого гормона. Если после подкожной инъекции раствора инсулина максимальное снижение уровня глюкозы в крови обычно достигается через 45 мин, то при пероральном введении Рансулина это время увеличивалось до 65–80 мин, что может существенно ограничить его клиническое применение.

Очевидно, что определяющий вклад в скорость выделения инсулина из гидрогеля, при прочих равных условиях, вносят структурные особенности гидрогеля, в частности размеры пор и характер их распределения.

Наиболее распространенным способом получения ПААГ является радикальная сополимеризация акриламида и бифункционального сшивателя – N,N'-метиленбисакриламида в водном растворе под действием окислительно-восстановительной каталитической системы [11]. При этом структура полученных гидрогелей характеризовалась широким распределением пор по размерам. Проведение сополимеризации в присутствии, так называемого, передатчика цепи, ограничивающего молекулярную массу сополимера, образующегося на первой стадии процесса, приводила к существенному изменению структуры гидрогеля. Значительно (почти в два раза) сокращалось количество больших пор, проницаемых для белков с молекулярной массой (**ММ**) выше 100000 Да, и несколько уменьшается количество пор, проницаемых для белка с ММ 67000 Да.

Аналогичная закономерность наблюдалась и при получении препарата Рансулин сополимеризацией в присутствии ненасыщенного производного овомукоида (табл. 1). Из табл. 1 видно, что увеличение количества передатчика цепи приводило к повышению степени набухания гидрогеля, а главное, к более равномерному распределению

Таблица 1. Свойства инсулинсодержащих гидрогелей

№ пп	МУК $\times 10^3$, моль/л	Степень набухания, г воды/г полимера pH 7.2 (±8%)	Доступность пор для белка, % от общего количества пор, (±6%)		Распределение инсулина между гелем и раствором, (±2%)**	Выделение инсулина при pH 7.2, % от исх. (±4%) через		
			ММ белка 6.7×10^4	ММ белка 14.1×10^4		20 мин	45 мин	60 мин
1	0	10	80	53	52/48	40	61	66
2*	0	25	86	62	51/49	46	65	74
3	2.0	12	73	47	57/43	51	64	70
4	4.0	17	66	39	56/44	62	70	74
5	8.0	20	68	36	60/40	65	73	80
6	10.0	24	70	29	58/42	69	80	85

* Гидрогель получен при концентрации БИС 0.6%.

Таблица 2. Зависимость концентрации инсулина в плазме крови и экстрактах ткани печени крыс от способа введения препарата. (Доза инсулина 15 ед./кг. Приведены минимальные и максимальные значения для 4 животных)

Среда	Препарат, способ введения	Концентрация инсулина, мкЕд./мл			
		Исход	30 мин	60 мин	90 мин
Плазма крови	Раствор инсулина, инъекция	28–42	310–340	430–470	390–420
	1 перорально	33–40	64–75	90–105	128–145
	5 перорально	23–30	80–95	132–139	128–140
Экстракт ткани печени	Раствор инсулина, инъекция	32–37	49–62	74–83	90–104
	1 перорально	30–37	163–176	214–254	152–184
	5 перорально	44–49	223–240	210–233	160–175

пор по размерам за счет снижения количества больших пор, проницаемых для белков с ММ 100000 Да и выше. Повышение доли пор меньшего размера, то есть увеличение поверхности полимера, разделяющей поры, сопровождалось некоторым ростом количество инсулина, которое поглощалось гирогелем из раствора гормона.

Изменение характера распределения приводило к значительному изменению кинетики выделения инсулина из гидрогеля в раствор. Чем уже распределение пор по размерам (за счет снижения количества больших пор), тем выше скорость выделения инсулина в раствор. При этом оказалось, что именно распределение пор по размерам, а не степень набухания гидрогеля, определяла в данном случае скорость выделения гормона. Выделение инсулина из гидрогелей с близким распределением пор (образцы 1 и 2), но различающихся степенью набухания, происходила с практически одинаковой скоростью.

В табл. 2 приведены результаты измерения концентрации инсулина в плазме крови и экстрактах ткани печени крыс при пероральном введении синтезированных препаратов и при инъекциях раствора инсулина. Видно, что, во-первых, как и было предположено в работе [2] и экспериментально показано в работе [12], при пероральном введении синтезированных гидрогелей, в отличие от инъекций, инсулин полностью повторял физиологический путь движения гормона в организме, т.е., первоначально он накапливался в печени и только затем поступал в кровоток. Во-вторых, максимальная концентрация инсулина в крови для инъекционного гормона и перорально введенного модифицированного препарата (№ 5) достигалась практически в одно и то же время (около 60 мин). При использовании немодифицированного гидрогеля это время составляло 90 мин.

В табл. 3 приведены результаты изучения гипогликемической активности синтезированных препаратов. Из таблицы видно, что использование модифицированного гидрогеля действительно обеспечивало сокращение времени достижения максимального эффекта снижения концентрации глюкозы в крови, приближая его к аналогичному параметру, достигаемому при инъекционном введении раствора инсулина.

Таким образом, совокупность всех полученных результатов позволяла сделать вывод, что при пероральном введении инсулина в гидрогеле с узким распределением пор по размерам не только реализовался естественный путь поступления инсулина в кровь через печень, но и время достижения максимального эффекта существенно приближалось ко времени, достигаемому при инъекциях раствора гормона. Принимая во внимание

Таблица 3. Зависимость концентрации глюкозы в крови кроликов от времени перорального введения препарата. (Средние значения для 6 животных. Исходная концентрация глюкозы 90–114 мг/100 мл.)

Препарат	Концентрация глюкозы в крови, % от исх. (±8%)				
	30 мин*	45 мин*	65 мин*	80 мин*	90 мин*
1	90	78	66	**64**	70
2	96	80	62	**50**	57
3	88	64	**57**	65	65
4	83	62	**55**	62	67
5	85	56	**60**	63	74
6	82	60	**56**	68	76
Инсулин, инъекция	46	34	**30**	44	50

* Время после введения препарата.

положительные результаты испытания препаратов на животных, можно сделать осторожный вывод о том, что синтезированные препараты после всесторонних медико-биологических испытаний при лечении сахарного диабета могут быть альтернативой инъекциям инсулина.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986).

Авторы выражают искреннюю благодарность Л.К. Старосельцевой за помощь в организации работы с животными.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saffran M., Pansky B., Colin Budd G., Williams F.E.* // J. Control. Release. 1997. V. 46. № 1. P. 89–94.
2. *Wong C.Y., Martinez J., Dass C.R.* //J. Pharm. Pharmacol. 2016. V. 68. № 9. P. 1093–1108.
3. *Banerjee A., Wong J., Gogoi R., Brown T., Mitragotri S.* // J. Drug Target. 2017. V. 25. № 7. P. 608–615.
4. *Banerjee A., Hee Lee J., Samir Mitragotri S.* // Bioeng. Transl. Med. 2016. V. 1. № 3. P. 338–346.
5. *Su F.-Y., Lin K.-J., Sonaje K., Wey S.-P., Yen T.-C., Ho Y.-C., Panda N., Chuang E.-Y., Maiti B., Sung H.-W.* // Biomaterials. 2012. V. 33. № 9. P. 2801–2811.
6. *Chuang E.-Y., Lin K.-J., Su F.-Y., Mi F.-L., Maiti B., Chen C.-T., Wey S.P., Yen T.-C., Juang J.-H., Sung H.-W.* // J. Control Release 201.3 V. 172. № 2. P. 513–522.
7. *Sheng J., He H., Han L., Qin J., Chen S., Ru G., Li R., Yang P., Wang J., Yang V.C.* // J. Control. Release. 2016. V. 233. № 2. P. 181–187.
8. *Li X., Guo S., Zhu C., Zhu Q., Gan Y., Rantanen J., Rahbek U.L., Hovgaard L.* // Biomaterials. 2013. V. 34. № 37. P. 9678–9684.
9. *Григорьев А.И., Платэ Н.А., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Гончарова А.Г.* // Клиническая медицина. 2005. Т. 83. № 1. С. 32–35.
10. *Платэ Н.А., Княжев В.А., Валуев Л.И.* // Вестник РАН. 2001. Т. 71. № 10. С. 899–914.
11. *Ванчугова Л.В., Валуев Л.И., Валуев И.Л., Талызенков Ю.А.* // Высокомолекулярные соединения. 2013. Т. 55. № 2. С. 225–228
12. *Валуев Л.И., Валев И.Л., Старосельцева Л.К., Ванчугова Л.В.* // Хим.-фарм. журн. 2019. Т. 53. № 4. С. 20–23.

Modified Hydrogel – Carrier of Oral Insulin

L. I. Valuev *, I. L. Valuev[a], L. V. Vanchugova[a] and , and I. V. Obydennova[a]

[a]*A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: valuev@ips.ac.ru*

The effect of the structure of a mucoadhesive insulin-containing polymeric hydrogel on the rate of hormone release was studied. It has been shown that a decrease in the pore size of the hydrogel leads to an increase in the rate of insulin release, which contributes to a reduction in the time to achieve a positive effect upon oral administration of the drug while maintaining the physiological pathway of the hormone penetration into the blood through the liver.

Keywords: diabetes, oral insulin, polyacrylamide hydrogel

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 274–281

УДК 546.57:544.77.032.1:615.28

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА И ОСТАТКИ ФЕНОЛА

© 2021 г. Н. А. Самойлова[1, *], М. А. Краюхина[1], Н. М. Анучина[2], Д. А. Попов[2]

[1]*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

[2]*Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева Минздрава России, Москва, 121552 Россия*

**e-mail: samoilova.nadezhda@gmail.com*

Поступила в редакцию 09.11.2020 г.
После доработки 04.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Получены водорастворимые полимерные композиты, содержащие два антимикробных компонента – наночастицы серебра и фенольные лиганды. Остатки малеиновой кислоты используемой матрицы – сополимера малеиновой кислоты с этиленом, – позволяли получать нековалентные полимерные коньюгаты *п*-аминофенола, которые легко термически трансформировались в реакционноспособные остатки малеинового ангидрида, что позволяло синтезировать также ковалентные полимерные комплексы *п*-аминофенола. Наночастицы серебра получали восстановлением соответствующей соли металла боргидридом натрия в присутствии полимерных коньюгатов фенола. Полученные коллоидные растворы препаратов были активны в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов. Минимальные подавляющие концентрации комплексных препаратов в отношении *Escherichia coli* составляли 32 и 64 мкг/мл *Pseudomonas aeruginosa* – 8 и 16 мкг/мл и *Candida albicans* – 4 и 8 мкг/мл для содержащих наносеребро нековалентных и ковалентных полимерных комплексов *п*-аминофенола, соответственно. Выявлен выраженный синергетический эффект антибактериальных компонентов препаратов в отношении указанных штаммов микроорганизмов. Фракционные ингибирующие концентрационные индексы полученных препаратов были меньше 0.5.

Ключевые слова: сополимер малеиновой кислоты, наночастицы серебра, фенол, антимикробные свойства

DOI: 10.31857/S0555109921030119

Возрастающая резистентность к антибиотикам популяционно опасных микроорганизмов по отношению к традиционно применяемым лекарствам представляет собой одну из актуальных проблем современной фармакологии и терапии [1, 2]. Альтернативой традиционным методам борьбы с устойчивыми формами бактерий и грибов (поиск природных и синтез новых антибиотиков) является использование “наноантибиотиков” [3–6]. Основное внимание последнее время уделяется материалам на основе наночастиц органической и, наиболее часто, неорганической природы – это наночастицы ряда металлов и оксидов металлов [3, 7–9].

Большинство разработок касается синтеза, исследования свойств и использования наночастиц серебра (**НЧС**), как представлено в недавних обзорах [10, 11]. К НЧС нет толерантности у большинства патогенов [11, 12]. С другой стороны, давно известен дешевый и доступный антисептик – фенол [13]. Его использовали в тест-системах при стандартизации бактерицидных агентов с использованием специфических тестовых микроорганизмов [14]. Ранее фенол широко применяли в составе антисептических средств наружного применения, средств для дезинфекции оборудования или ряда органических материалов. В последнее время его использование в медицине и фармации ограничено из-за раздражающих, коррозийных свойств и потенциальной системной токсичности. Негативные свойства фенола значительно снижаются в ряду его низкомолекулярных производных, например, тирозин, ванилин, салициловая кислота, *п*-аминофенол и т.д., и полимерных (прополис, таннин, лигнин, и др.) производных. При этом ряд синтетических и выделенных из природных источников низкомолекулярных производных фенола сохраняют антибактериальные свойства [15–23]. Показано, например, что использование соединений фенола

может быть альтернативной стратегией для нейтрализации растущей устойчивости к противогрибковым препаратам [24]. Известны также эффективные в отношение ряда патогенов полимерные формы фенола, как природного происхождения [25–27], так и синтезированные [28–32].

Комбинирование наносеребра с полимерным производным фенола при выраженном антимикробном эффекте обоих компонентов может привести к снижению действующей концентрации такого комплексного препарата, его токсичности и количества более дорогого компонента системы – наносеребра, что, в свою очередь, может снизить стоимость активной дозы антимикробной субстанции. До настоящего времени такие комплексные препараты не были получены и исследованы.

Ранее были синтезированы полимер-стабилизированные наночастицы серебра и показана перспектива их использования в качестве антимикробных агентов как таковых [33–35], так и в комбинации с традиционными антибиотиками [36], а также препаратов, содержащих специфические маркеры лектинов поверхности клеток патогенов [37]. Применение в качестве полимеров-стабилизаторов наночастиц металлов доступных, нетоксичных сополимеров малеинового ангидрида (кислоты) может иметь ряд преимуществ. Основное – легкость модификации сополимеров в ангидридной форме с получением ковалентных коньюгатов с различными гидроксид- или аминосодержащими лигандами в мягких условиях, без применения конденсирующих средств. Возможно также получение и нековалетных, ионных комплексов с аминосодержащими лигандами при использовании сополимеров в форме сополимеров малеиновой кислоты [37, 38].

Цель настоящей работы – получение полимерных комплексных препаратов, содержащих фенольные группировки и частицы наносеребра, стабилизированные сополимером малеиновой кислоты, а также исследование их антимикробных свойств. В данном исследовании для получения такого комплекса использовано менее токсичное, чем фенол, соединение – *пара*-аминофенол [39], крупнотоннажный продукт, широко используемый в химической промышленности, фармацевтике (при производстве парацетамола, метола, амидола, глицина) и др.

МЕТОДИКА

Реактивы и материалы. Сополимеры этилена и малеиновой кислоты (**ЭМК**) получали гидролизом (путем растворения в деионизованной воде с последующим лиофильным высушиванием) чередующегося сополимера этилена и малеинового ангидрида (**ЭМА**) (“Monsanto”, США, $M_w = 2.5 \times 10^4$). $AgNO_3$, $NaBH_4$, *п*-аминофенол (***п*-АФ**) – производства “Sigma-Aldrich” (США). Диметилформамид, NaOH – производства “Реахим” (Россия).

В работе использовали 3 штамма условно-патогенных микроорганизмов (“BD Microtrol™”, “Becton Dickinson”, США): грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 12903/ATCC 27853) и *Escherichia coli* (NCTC 11954/ATCC 35218), а также дрожжеподобный гриб *Candida albicans* (NCPF3255/ATCC 2091).

Получение полимер-стабилизированных НЧС. **Получение ЭМК/Ag^0.** К свежеприготовленному раствору 96 мг сополимера ЭМК в 448 мл бидистиллированной воды, доведенному 1.0 М NaOH до pH 7.0, прибавляли при интенсивном перемешивании 6.24 мл раствора 0.1 М $AgNO_3$; через 0.5 ч к полимерной соли при интенсивном перемешивании прибавляли свежеприготовленный водный раствор 0.1 М $NaBH_4$ в 2-кратном мольном избытке по отношению к ионам серебра. После перемешивания в течение суток при комнатной температуре препарат подвергали ультрафильтрации (мембрана YM5, Diaflo, “Amicon Corporation”, США) и затем лиофильному высушиванию (–55°C, 0.05 мбар). Препарат содержал 40% (по массе) наносеребра (данные элементного анализа).

Получение коньюгатов НЧС и п-АФ. *Получение нековалентного (**н/ков**) коньюгата ЭМК/Ag^0/п-АФ.* *п*-АФ (30 мг) растворяли при перемешивании и нагревании до 50°C в 5 мл бидистиллированной воды, затем добавляли 100 мг ЭМК (предварительно гидролизованного ЭМА путем растворения в деионизованной воде с последующим лиофильным высушиванием), реакционную смесь перемешивали 5 ч при комнатной температуре. К полученному раствору добавляли 95 мл бидистиллированной воды и доводили pH до 7.0 1.0 М раствором NaOH, а затем при перемешивании прибавляли 7 мл раствора 0.1 М $AgNO_3$. Через 5 мин при интенсивном перемешивании прибавляли 14 мл свежеприготовленного водного раствора 0.1 М $NaBH_4$. После перемешивания в течение суток при комнатной температуре препарат подвергали ультрафильтрации (мембрана YM5, DIAFLO, AMICON CORPORATION) и лиофильно высушивали (–55°C, 0.05 мбар). Препарат содержал 30% (по массе) наносеребра и 14.3% (по массе) *п*-АФ (данные элементного анализа).

Получение ковалентного коньюгата ЭМК/Ag^0/п-АФ (ков). К раствору 100 мг ЭМА в 1.5 мл диметилформамида прибавляли при перемешивании 30 мг *п*-АФ, затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение суток. Препарат подвергали ультрафильтрации и затем лиофильному высушиванию (–55°C, 0.05 мбар). 70 мг полученного препарата ЭМК/*п*-АФ (ков) растворяли в 70 мл бидистиллированной воды, доводили до pH 7 с помощью 1М NaOH, затем при перемешивании прибавляли 5 мл раствора

$AgNO_3$ (0.1 М); через 5 мин при интенсивном перемешивании прибавляли 10 мл свежеприготовленного водного раствора $NaBH_4$ (0.1 М). После перемешивания в течение суток при комнатной температуре препарат подвергали лиофильному высушиванию (55°С, 0.05 мбар) после ультрафильтрации реакционной смеси. Препарат содержал 35% (весов.) наносеребра и 3.7% (весов.) *n*-АФ (данные элементного анализа).

Методы исследования коньюгатов. Величину pH среды регистрировали с помощью pH-метра "Fisher Scientific 300 403.1" (США). Оптические спектры регистрировали на спектрофотометре "Hitachi U-5100" (Япония) с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. Изображения НЧС были получены на просвечивающем электронном микроскопе "LEO 912 AB" ("Omega", "Karl Zeiss", Германия) с магнитным омега спектрометром с энергетическим фильтром, интегрированным непосредственно в оптическую систему инструмента. Напряжение ускорения электронов составляло E = 100 кВ; увеличение: от 80× до 500000×; разрешение изображения: 0.2–0.34 нм. Для исследований каплю исследуемого раствора помещали на 3 мм медную сетку, покрытую формваром, и высушивали в вакууме.

ИК спектры регистрировали с помощью ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием Nicolet Magna IR-720 (США). Данные об элементном составе препаратов получены в лаборатории микроанализа ИНЭОС РАН.

Определение активности НЧС и их коньюгатов в отношении условно-патогенных микроорганизмов. Определение минимальной подавляющей концентрации (**МПК**) синтезированных препаратов в отношении исследуемых штаммов осуществляли методом серийных микроразведений в триптиказо-соевом бульоне ("Bio-Rad Laboratories", США) на планшете по стандартной методике (Методические указания МУК 4.2. 1890-04 "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам"). Тестирование проводили в объеме 0.2 мл с использованием стерильного 96-луночного планшета для иммунологических исследований. Конечная концентрация клеток исследуемого микроорганизма – 10^5 КОЕ/мл. Триптиказо-соевый бульон разливали по 0.1 мл в каждую лунку планшета. Количество лунок определялось необходимым диапазоном разведений, последняя лунка оставлялась для постановки отрицательного контроля. В первую лунку с 0.1 мл бульона вносили и 0.1 мл исследуемого препарата. Тщательно перемешивали смесь и затем переносили 0.1 мл смеси во вторую лунку, содержащую первоначально 0.1 мл бульона. Процедуру повторяли до приготовления необходимого ряда разведений.

Для инокуляции использовали суспензию клеток тестируемых микроорганизмов, приготовленную на питательном бульоне. По 0.1 мл инокулята вносили в лунку с 0.1 мл исследуемого препарата соответствующего разведения, последняя лунка была с питательным бульоном без исследуемого препарата (положительный контроль). Приготовленную суспензию проверяли на чистоту путем высева на плотные питательные среды, контролировали также рост культуры в бульоне без препарата (положительный контроль).

Планшеты, закрытые стерильной пленкой, инкубировали при температуре 35°С в течение 24 ч. При использовании *C. albicans* время инкубирования составляло 48 ч. Рост культуры в присутствии препаратов сравнивали с ростом культуры в референтной ячейке без препарата (положительный контроль) при визуальном контроле планшета в проходящем свете. МПК определяли по наименьшей концентрации препарата в ячейке, подавляющей видимый рост тестируемого микроорганизма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез препаратов. Полимерный наноконьюгат серебра (ЭМК/Ag^0) получали по ранее описанной нами методике восстановления катионов серебра боргидридом натрия в присутствии полимера-стабилизатора – гидролизованного сополимера малеинового ангидрида с этиленом [40].

Содержащий наносеребро нековалентный коньюгат *n*-аминофенола (ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (н/ков.) получали в две стадии: получение полимерной соли карбоксилсодержащего полимера и *n*-аминофенола ($-CH_2-CH_2-CHCOOH-CHCOO^-$)($NH_3^+C_6H_4OH$)$-)_n$ и введение в полимерный коньюгат наночастиц серебра по ранее описанной методике получения ЭМК/Ag^0 [40]. При этом растворимость *n*-аминофенола в воде повышалась в присутствии карбоксил-содержащего полимера.

Для получения ковалентного композита ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (ков.) в начале проводили термическую активацию сополимера, затем реакционноспособные ангидридные группы сополимера образовывали амидную связь с аминогруппами *n*-аминофенола ($-CH_2-CH_2-CHCOOH-CHCO$)(NHC_6H_4OH)$-)_n$. Далее, аналогично вышеописанному, полученный коньюгат использовали в качестве полимерного стабилизатора при формировании наночастиц серебра. Ранее фенольный лиганд в сополимер малеинового ангидрида с этиленом вводили более сложным путем: в ангидридную форму сополимера вначале вводили диамины – этилендиамин или гексаметилендиамин, а затем иммобилизовывали на аминосодержащий полимер 4-гидроксибензальдегид [31].

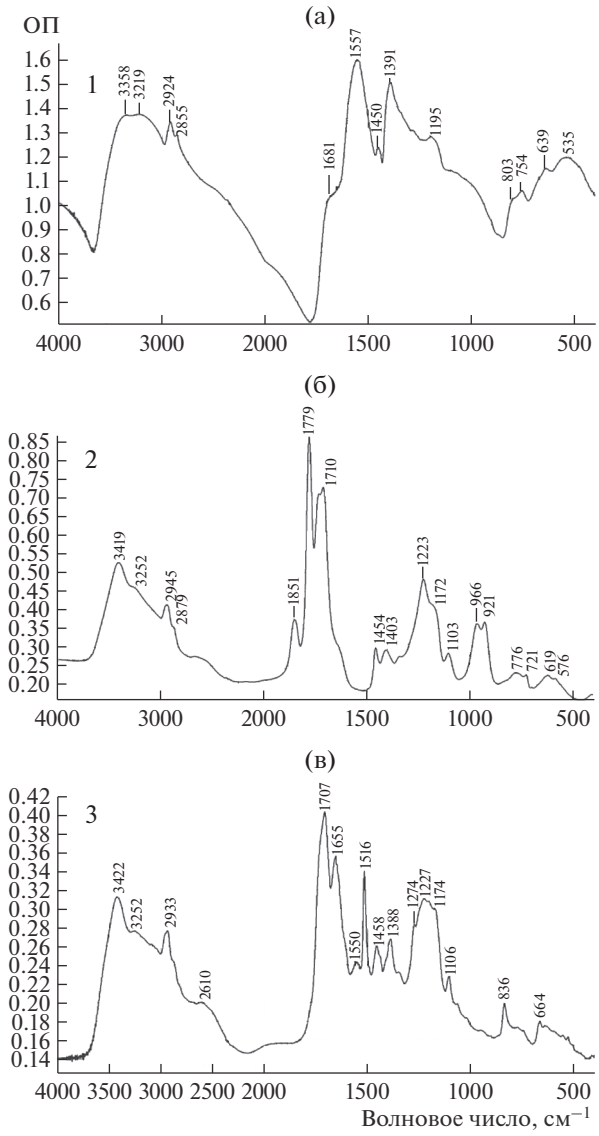


Рис. 1. ИК-спектры ЭМК (а), ЭМА (б) и ЭМК/п-АФ (ков.) (в).

Характеристика препаратов. ИК-спектры образцов исходного сополимера, его активированной формы и ковалентного коньюгата с *n*-аминофенолом представлены на рис. 1.

В ИК-спектре ЭМК (рис. 1а) присутствовали колебания карбонилов ионизированных карбоксильных группы ν C=O 1395, 1559 см$^{-1}$. Термическая обработка сополимера – ЭМА (рис. 1б) приводила к появлению в спектре полос при 1779 и 1710 см$^{-1}$, соответствующих циклической структуре янтарного ангидрида. Характерные колебания амидной связи при 1655 см$^{-1}$ (Амид I), 1551 см$^{-1}$ (Амид II) обнаружены в спектре ЭМК/*n*-АФ (ков.), 1516 см$^{-1}$ – C=C связь, 1227 см$^{-1}$ C–O – полоса спиртовой группы (рис. 1в).

ПЭМ-изображения НЧС в полученных препаратах представлены на рис. 2. Форма НЧС во всех исследованных образцах золей близка к сферической. Диаметр частиц серебра для всех образцов был в диапазоне 2–10 нм. Форма НЧС во всех исследованных образцах золей близка к сферической. Диаметр частиц серебра для всех образцов был в диапазоне 2–10 нм.

На рис. 3 представлены оптические спектры препаратов НЧС. Значения максимума пика плазмонного резонанса для всех использованных коллоидных препаратов, содержащих наночастицы серебра варьировалось от 406 до 420 нм при близких значениях диаметров НЧС (ПЭМ).

Действие полученных композитов на условно-патогенные микроорганизмы. Данные по активности препарата наночастиц серебра и композитов в отношении грамотрицательных *E. coli* и *P. aeruginosa*, а также дрожжеподобного гриба *C. albicans,*- представлены в табл. 1. Значения МПК определяли как наименьшие концентрации антимикробного агента, ингибирующие видимый рост микроорганизма, при использовании метода серийных микроразведений.

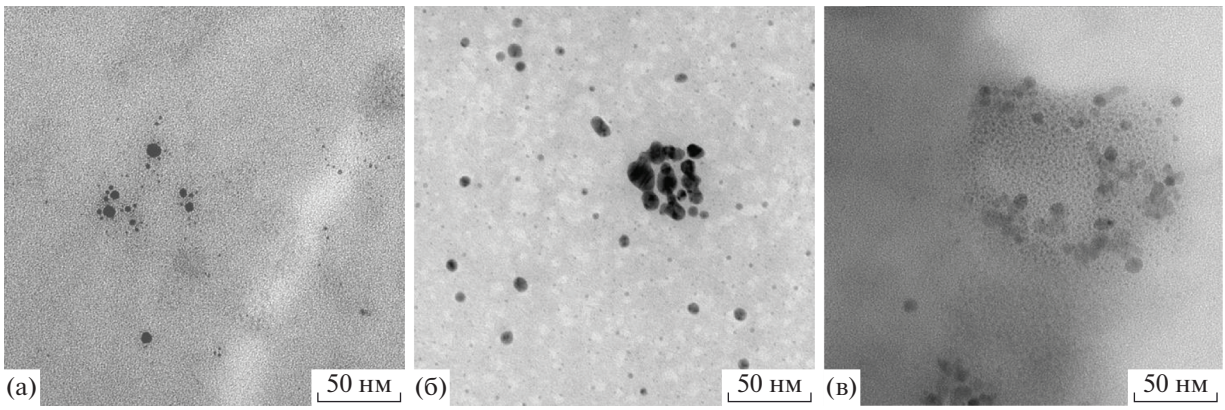


Рис. 2. ПЭМ микрофотографии частиц нанокомплекса серебра ЭМК/Ag^0 (а), композитов ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (н/ков.) (б) и ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (ков.) (в).

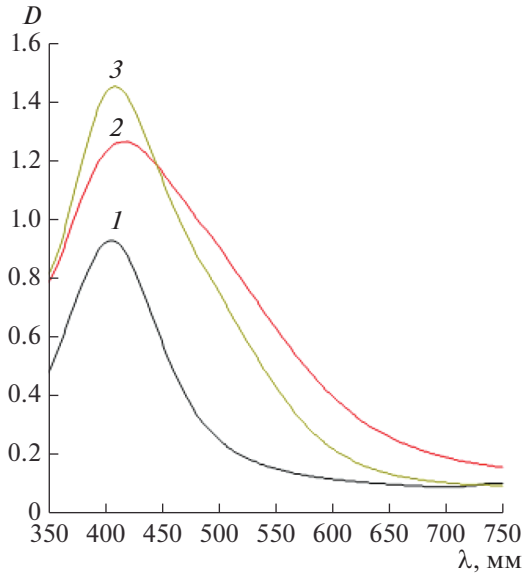


Рис. 3. Оптические спектры ЭМК/Ag^0 (*1*), ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (*2*, н/ков.) и ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (*3*, ков.).

Согласно полученным данным все использованные препараты проявляли активность в отношение всех исследованных микроорганизмов. Поскольку содержание наносеребра и остатков *n*-аминофенола в препаратах различалось, сравнение активности синтезированных препаратов проводили с учетом количества действующего вещества в образцах (МПК наносеребра и *n*-АФ в препарате). Антимикробные свойства препаратов наносеребра на основе полимеров-стабилизаторов – сополимеров малеиновой кислоты, – были продемонстрированы нами ранее [35], также были исследованы такие препараты в комбинации с антибиотиками [36, 37]. С другой стороны, описаны антимикробные свойства полимерных производных *n*-АФ [31]. Ранее комплексные препараты, содержащие наночастицы серебра и остатки *n*-АФ (лиганды фенола), не были получены и их антимикробные свойства не исследовались.

Для оценки степени взаимного влияния антимикробных компонентов: *n*-аминофенола (А) и наночастиц серебра, стабилизированных сополимером этилена и малеиновой кислоты (В) – в их коньюгатах рассчитаны фракционные ингибирующие концентрации (**ФИК**) и фракционные ингибирующие концентрационные индексы (**ФИКИ**):

$$\text{ФИК (А)} = \text{МПК (А в АВ)}/\text{МПК (А отдельно)};$$

$$\text{ФИК (В)} = \text{МПК (В в АВ)}/\text{МПК (В отдельно)};$$

$$\text{ФИКИ} = \text{ФИК (А)} + \text{ФИК (В)}.$$

Расчетные данные ФИКИ для полученных препаратов приведены в табл. 1.

Значения ФИКИ интерпретируются различными исследователями по-разному [42–48], но все исследователи придерживались точки зрения, что взаимодействие компонентов системы определялось как синергетическое в тех случаях, когда значения ФИКИ были меньше или равны 0.5. Для всех исследованных образцов рассчитанные значения ФИКИ попадают в этот диапазон, что свидетельствует о том, что введение в препарат наносеребра фенольных лигандов увеличивает их активность в отношении микроорганизмов различных классов. По-видимому, это связано с разными механизмами воздействия наносеребра и фенольного компонента на клетки патогена. Так, показано, что наночастицы серебра при контакте с клетками бактерий образуют свободные радикалы, которые обладают способностью повреждать клеточную мембрану. Также наночастицы могут высвобождать ионы серебра, и эти ионы могут взаимодействовать с тиольными группами многих жизненно важных ферментов и инактивировать их, а также разрушать ДНК, что приводит к гибели клеток [49]. Фенольные соединения, в отличие от традиционных антибиотиков, обладают неспецифическими антимикробными свойствами, воздействуя на бактериальную стенку, цитоплазму и ядро на уровне хромосом [13]. Кроме того, поскольку клеточная мембрана обладает слабым отрицательным зарядом, введение фенольного лиганда снижает отрицательный заряд частиц нанокомпозита, что также может способствовать его поглощению клеткой микроорганизма.

Препарат, содержащий солевую форму *n*-АФ ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (н/ков.) был несколько более активен, чем композит с ковалентным присоединением *n*-АФ, что, по-видимому, связано большей конформационной подвижностью лиганда, а также возможной диссоциацией нековалентного комплекса с отщеплением данного лиганда.

Таким образом, в настоящей работе были получены водорастворимые комплексные препараты, содержащие два антимикробных компонента – наночастицы серебра и остатки *n*-АФ. Полимерная соль *n*-АФ экранирует аминогруппу и повышает стабильность *n*-АФ к окислению в его коньюгате. Остатки малеиновой кислоты используемого сополимера легко термически трансформируются в реакционноспособные остатки малеинового ангидрида, что позволяет синтезировать кроме нековалентных, также и ковалентные комплексы аминосодержащего лиганда. Поскольку аминогруппа *n*-аминофенола вовлечена во взаимодействие с полимерной матрицей, на полимерной матрице таким образом позиционируются остатки фенола. Синтез препаратов на всех стадиях – введение фенольного лиганда и формирование наночастиц серебра, прост в осуществлении, условия реакции легко воспроизводимы. Полученные препараты после очистки и высушивания могут сохра-

Таблица 1. Данные по составу и активности препаратов в отношении исследованных штаммов

Препарат	Содержание в препарате активного компонента, %		МПК, мкг/мл			ФИК		ФИКИ
	Ag^0	*n*-АФ	Препарат	Ag^0 в препарате*	*n*-АФ в препарате*	ФИК Ag^0	ФИК *n*-АФ	
			E. coli					
n-АФ	–	100	64 [41]	–	64	–	–	–
ЭМК/Ag^0	40	–	256	102.4	–	–	–	–
ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (н/ков.)	30	14.3	32	9.6	4.58	0.094	0.071	0.165
ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (ков.)	35	3.7	64	22.4	2.37	0.22	0.037	0.257
			P. aeruginosa					
n-АФ	–	100	64 [41]	–	64	–	–	–
ЭМК/Ag^0	40	–	64	25.6	–	–	–	–
ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (н/ков.)	30	14.3	8	2.4	1.14	0.09	0.018	0.108
ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (ков.)	35	3.7	16	5.6	0.59	0.22	0.009	0.229
			C. albicans					
n-АФ	–	100	100 [41]	–	100	–	–	–
ЭМК/Ag^0	40	–	32	12.8	–	–	–	–
ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (н/ков.)	30	14.3	4	1.2	0.57	0.094	0.006	0.100
ЭМК/Ag^0/*n*-АФ (ков.)	35	3.7	8	2.8	0.30	0.22	0.003	0.223

* Рассчитано по данным МПК препарата с учетом содержания в препарате действующего вещества.

няться в сухом виде длительное время без потери свойств. Коллоидные растворы полученных препаратов были активны в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов. Выявлен синергетический эффект антибактериальных компонентов в использованных препаратах в отношении *E. coli, P. aeruginosa* и *C. albicans*. Наличие в коньюгате более дешевого компонента системы – *n*-АФ, – позволило снизить активную дозировку препарата, при этом снижалось также содержание более дорогого компонента системы – наносеребра. Предложенный вариант комбинации антимикробных агентов может быть расширен при использовании в системе наноформ иных металлов или оксидов металлов с бактерицидными свойствами.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием научного оборудования Центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Михалёва Т.В., Захарова О.И., Ильясов П.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 2. С. 124–132.
2. *Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Careyetal R.B* // Clin. Microbiol. Infect. 2012. V. 18. № 3. P. 268–281.
3. *Beyth N., Houri-Haddad Y., Domb A., Khan W., Hazan R.* // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015. V. 2015. Article ID 246012. https://doi.org/10.1155/2015/246012
4. *Pelgrift R.Y., Friedman A.J.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2013. V. 65. № 13–14. P. 1803–1815.
5. *Huh A.J., Kwon Y.J.* // J. Control Release. 2011. V. 156. № 2. P. 128–145.
6. *Hemeg H.A.* // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 8211–8225.
7. *Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A.* // Molecules. 2016. V. 21. № 7. P. 836. https://doi.org/10.3390/molecules21070836
8. *Jamdagni P., Sidhu P.K., Khatri P., Nehra K., Rana J.S.* // Advances in Animal Biotechnology and its Applications. /Eds. S.K. Gahlawat, J.S., Duhan, R.K. Salar, P. Siwach, S. Kumar, P. Kaur. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. P. 143–160.
9. *Nilesh K., Umama Y., Khan M. G., Kkushwah M., Ayush K.* // IJETIR. 2019. V. 6. № 6. P. 140–146.
10. *Al-Hasnawy H.H.* // *Int. J. Psychosoc. Rehabilitation*. 2020. V. 24. № 5. P. 4217–4224.
11. *Medici S., Peana M., Nurchi V.M., Zoroddu M.A.* // J. Med. Chem. 2019. V. 62. № 13. P. 5923–5943.
12. *Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M.* // Molecules. 2015. V. 20. № 5. P. 8856–8874.
13. *Sabbineni J.* // JOMC. 2016. V. 3. № 2. P. 182–188.
14. *Nandhini R., Sumathy V.J.H.* // IJCTPR. 2016. V. 4. № 6. P. 355–361.
15. *Lucchini J.J., Corre J., Cremieux A.* // Res. Microbiol. 1990. V. 141. P. 499–510.
16. *Cronin M.T.D., Schultz T.W.* // Chemosphere. 1996. V. 32. № 8. P. 1453–1468.
17. *Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M.* // J. Appl. Microbiol. 2001. V. 90. № 4. P. 494507.
18. *Maddox C.E., Laur L.M., Tian L.* // Curr. Microbiol. 2010. V. 60. № 1. P. 53–58.
19. *Alves M.J., Ferreira I.C., Froufe H.J., Abreu R. M., Martins A., Pintado M.* // J. Appl. Microbiol. 2013. V. 115. № 2. P. 346–357.
20. *Villalobos M.C., Serradilla M.J., Martin A., Ordiales E., Ruiz-Moyano S., Cordoba M.G.* // J. Sci. Food Agric. 2016. V. 96. P. 2116–2124.
21. *Pinheiro P.F., Menini L.A.P., Bernardes P.C., Saraiva S.H., Carneiro J. W. M., Costa A.V. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2018. V. 66. P. 323–330.
22. *Walsh D.J., Livinghouse T., Goeres D.M., Mettler M., Philip S.S.* // Front. Chem. 2019. V. 7. Article 653. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00653
23. *Teodoro G.R., Ellepola K., Seneviratne C.J., Koga-Ito C.Y.* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Article 1420. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01420
24. *Negri M., Salci T.P., Shinobu-Mesquita C.S., Capoci I.R., Svidzinski T.I., Kioshima E.S.* // Molecules. 2014. V. 19. P. 2925–2956.
25. *Tafesh A., Najami N., Jadoun J., Halahlih F., Riepl H., Azaizeh H.* // Evid. Based Complementary Altern. Med. 2011. P. 1–9. Article ID 431021. https://doi.org/10.1155/2011/431021
26. *Shahzad M., Millhouse E., Culshaw S., Edwards C.A., Ramage G., Combet E.* // Food Funct. 2015. V. 6. P. 719–729.
27. *Coppo E., Marchese A.* // Curr. Pharm Biotechnol. 2014. V. 15. P. 380–390.
28. *Jeong J.-H., Byoun Y.-S., Lee Y.-S.* // React. Funct. Polym. 2002. V. 50. P. 257–263.
29. *Kenawy E.R., Abdel-Fattah Y.R.* // Macromol.Biosci. 2002. V. 2. P. 261–266.
30. *Nonaka T., Uemura Y., Ohse K., Jyono K., Kurihara S.* // J. Appl. Polym. Sci. 1997. V. 66. P. 1621–1630.
31. *El-Newehy M.H., El-Hamshary H., Alamri A., Al-Deyab S.S.* // Int. J. Polym. Mater. 2014. V. 63. № 11. P. 563–575.
32. *Park E.S., Moon W.S., Song M.J., Kim M.N., Chung K.H., Yoon J.S.* // Int. Biodeter. Biodegr. 2001. V. 47. P. 209–214.
33. *Samoilova N., Kurskaya E., Krayukhina M., Askadsky A., Yamskov I.* // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. № 11. P. 3395–3403.
34. *Самойлова Н.А., Краюхина М.А., Попов Д.А., Анучина Н.М., Ямсков И.А.* // Биотехнология. 2015. № 1. С. 75–84.
35. *Самойлова Н.А., Краюхина М.А., Вышиванная О.В., Благодатских И.В., Попов Д.А., Анучина Н.М., Ямсков И.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 2018. № 6. С. 1010–1017.
36. *Samoilova N., Krayukhina M., Popov D., Anuchina N.* // Monatsh. Chem. 2019. V. 150. № 12. P. 2071–2080.

37. *Samoilova N.A., Krayukhina M.A., Popov D.A., Anuchina N.M., Piskarev V.E.* // Biointerface Res. Appl. Chem. 2018. V. 8. № 1. P. 3095–3099.

38. *Samoilova N.A., Krayukhina M.A., Babushkina T.A., Yamskov I.A., Likhosherstov L.M., Piskarev V.E.* // J. Appl. Polym. Sci. 2017. V. 134. № 16. P. 1–12. https://doi.org/10.1002/app44718

39. *Song H., Chen T.S.* // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2001. V. 15. № 1. P. 34–40.

40. *Самойлова Н.А., Благодатских И.В., Курская Е.А., Краюхина М.А., Вышиванная О.В., Абрамчук С.С., Аскадский А.А., Ямсков И.А.* // Коллоидный журн. 2013. Т. 75. № 4. С. 1–13.

41. *Hellal A., Chafaa S., Chafai N.* // International J. Scientific & Engineering Research. 2015. V. 6. № 8. P. 1622–1627.

42. *Liu W., Li L.P., Zhang J.D.* // PLoS One. 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103442

43. *Gupta A., Saleh N. M., Das R., Landis R. F., Bigdeli A., Motamedchaboki K., Campos A.R., Pomeroy K., Mahmoudi M., Rotello V.M.* // Nano Futures. 2017. 1:015004. https://doi.org/10.1088/2399-1984/aa69fb

44. *Konaté K., Mavoungou J.F., Lepengué A.N., Aworet-Samseny R.R.R., Hilou A., Souza A., Dicko M.H., Batchi B.M.* // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2012. 11:18. https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-18

45. *Sadiki M., Balouipi M., Barkai H., Maataoui H., Ibnsoudkoraichi S., Elabed S.* // Intern. J. Pharm. Pharm. Sci. 2014. V. 6. № 6. P. 121–124.

46. *Choi S.-M., Jang E.-J., Cha J.-D.* // Advanc. Biosci. Biotechnol. 2015. V. 6. P. 275–285.

47. *Cha J.D., Lee J.H., Choi K.M., Choi S.M., Park J.H.* // Evid. Based Complement Alternat. Med. 2014. 2014:450572. https://doi.org/10.1155/2014/450572

48. *Bassole I.H.N., Juliani H.R.* // Molecules. 2012. V. 17. № 4. P. 3989–4006.

49. *Prabhu S., Poulose E.K.* // Int. Nano Lett. 2012. V. 2. № 32. https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32

Investigation of Antimicrobial Properties of Praparations Based on Maleic Acid Copolymers Containing Silver Nanoparticles and Phenolic Residues

N. A. Samoilova[a], *, M. A. Krayukhina[a], N. M. Anuchina[b], and D. A. Popov[b]

[a]*A.N. Nesmeyanov Institute of organoelement compounds Russian academy of sciences, Moscow, 119991 Russia*

[b]*A.N. Bakulev national medical research center for cardiovascular surgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia*

**e-mail: samoilova.nadezhda@gmail.com*

In this work, water-soluble polymer composites containing two antimicrobial components – silver nanoparticles and phenol ligands, – were obtained. Maleic acid groups of the used matrix – a copolymer of maleic acid with ethylene, – contributed to the production of non-covalent polymer conjugates of *p*-aminophenol. In addition, they were easily thermally transformed into reactive residues of maleic anhydride, which allowed the synthesis of covalent polymer complexes of *p*-aminophenol. Silver nanoparticles were obtained by reducing the corresponding metal salt with $NaBH_4$ in the presence of phenol-polymer conjugates. The resulting colloidal solutions were active against a number of opportunistic microorganisms. The minimum inhibitory concentration of complex drugs against *Escherichia coli* was 32 and 64 μg/ml, of *Pseudomonas aeruginosa* – 8 and 16 μg/ml, and *Candida albicans* – 4 and 8 μg/ml for nanosilver contained non-covalent and covalent polymer complexes of *p*-aminophenol, respectively. A pronounced synergistic effect of antibacterial components in the used conjugates was revealed in relation to the specified strains of microorganisms; fractional inhibitory concentration indexes for the obtained composites were less than 0.5.

Keywords: silver nanoparticles, copolymer of maleic acid, фенол, antimicrobial properties, phenol-polymer conjugates

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 282–290

УДК 577.13:581.1

РОЛЬ МОДИФИКАЦИИ СИНТЕЗА NO В РЕАЛИЗАЦИИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПУТРЕСЦИНА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

© 2021 г. Ю. Е. Колупаев[1, *], А. И. Кокорев[1], М. А. Шкляревский[1], А. А. Луговая[1], Ю. В. Карпец[1], О. Е. Иванченко[1]

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

[2]*Днепровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, 49600 Украина*

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

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.
После доработки 23.11.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Исследовали значение оксида азота и его функциональных связей с активными формами кислорода (**АФК**) и кальцием в реализации стресс-протекторных эффектов полиамина путресцина на проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при гипертермии. Обработка проростков 1 мМ путресцином в течение 24 ч вызывала быстрое и транзиторное повышение содержания NO в корнях с максимумом через 1 ч после ее начала. При этом отмечалось двукратное увеличение активности диаминоксидазы (**ДАО**) и снижение активности нитратредуктазы в корнях на 25–30%. Ингибитор ДАО аминогуанидин полностью устранял повышение содержания NO, вызываемое путресцином. Увеличение активности ДАО и содержания NO устранялось и при обработке проростков антагонистами кальция этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусной кислотой (**ЭГТА**)и неомицином. Скавенджер оксида азота 2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (**PTIO)** полностью нивелировал эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при их обработке путресцином. В то же время обработка антагонистом пероксида водорода диметилтиомочевиной лишь немного уменьшала эффект повышения содержания NO в корнях, вызываемый путресцином. Антагонисты NO, АФК и кальция устраняли защитное действие путресцина при тепловом стрессе, определяемое по интенсивности перекисного окисления липидов и выживанию проростков. Сделано заключение о роли оксида азота, синтезирующегося по окислительному пути, и его функционального взаимодействия с АФК и ионами кальция в реализации стресс-протекторного действия путресцина на растительные объекты.

Ключевые слова: путресцин, оксид азота, диаминоксидаза, нитратредуктаза, активные формы кислорода, кальций, теплоустойчивость, *Triticum aestivum*

DOI: 10.31857/S0555109921030065

Полиамины – мультифункциональные физиологически активные вещества, синтез которых характерен для разных групп организмов [1]. У растений их относят к группе стрессовых метаболитов. Во многих работах обнаружено повышение эндогенного содержания полиаминов в ответ на стрессовые воздействия [2–4]. С другой стороны, показана способность экзогенных полиаминов индуцировать устойчивость растений к различным стресс-факторам [1, 3], в том числе к гипертермии [5].

К настоящему времени накоплен определенный объем сведений о механизмах стресс-протекторного действия полиаминов. В клеточной среде полиамины находятся в состоянии органических катионов, что обусловливает их связывание с отрицательно заряженными молекулами белков и нуклеиновых кислот [2]. Считается, что это способствует формированию функционально эффективной конформации макромолекул и их защите от действия гидролитических ферментов [6]. Показана также способность полиаминов ингибировать активность ДНКаз, РНКаз и протеаз [7]. Мембраностабилизирующее действие полиаминов обусловлено их связыванием с фосфолипидными головками [8]. Также полиамины в клетках могут оказывать прямое антиоксидантное действие, обусловленное связыванием свободных радикалов [9]. Показано, что полиамины обладают способностью модулировать изменение экспрессии отдельных генов непосредственно или путем влияния на процесс фосфорилирования транскрипционных факторов [8].

В последние годы однако феномены защитного действия полиаминов ассоциируют уже не только

с прямым влиянием на макромолекулы и клеточные структуры, а и с их вовлечением в сигнальные процессы [8]. Так, полиамины оказывают влияние на состояние ионных каналов различных типов. Имеются сведения об их способности ингибировать калиевые и неспецифические потенциал-независимые катионные каналы [10]. В то же время, показано, что путресцин может вызывать повышение концентрации цитозольного кальция в растительных клетках [11].

Катаболизм полиаминов с участием ди- и полиаминоксидаз приводит к образованию пероксида водорода в апопласте и пероксисомах [10]. Пероксид водорода является относительно долгоживущей активной формой кислорода с большим сигнальным потенциалом [12]. Его эффекты обусловлены вовлечением в редокс-регуляцию состояния многих белков, влиянием на функционирование ионных каналов и экспрессию ряда генов, важных для защитных реакций [13, 14].

Еще одним сигнальным посредником, вовлеченным в реализацию действия полиаминов, является оксид азота (**NO**). Показано повышение его содержания в проростках арабидопсиса [15] и каллусной культуре сои [16] при действии экзогенных полиаминов. Однако механизмы усиления генерации NO растениями под влиянием полиаминов пока изучены очень слабо. Предполагают, что NO может образовываться при их деградации с участием ди- и полиаминоксидаз. Так, в корнях растений арабидопсиса, нокаутных по Cu-аминоксидазе 1, в ответ на обработку путресцина образовывалось меньшее количество NO, чем у растений дикого типа [17]. Однако в семядолях и листьях таких различий не выявлено. С другой стороны, показана способность экзогенных путресцина, спермина и спермидина ингибировать (по крайней мере, временно) активность нитратредуктазы (**НР**) в листьях пшеницы [18]. Также показано снижение экспрессии гена НР у растений померанца (*Citrus aurantium*) при действии на них путресцина на фоне солевого стресса, что, в свою очередь, приводило к уменьшению количества нитрозилированных белков [19]. В последние годы получены сведения о значительном вкладе в синтез оксида азота именно пути восстановления нитратов с участием НР [20]. Таким образом, сведения о модификации синтеза NO у растений в присутствии полиаминов пока достаточно противоречивы. Тем более остается открытым вопрос о роли изменений NO-статуса растений в индуцировании их устойчивости к стрессорам экзогенными полиаминами.

Ранее было показано зависимое от образования пероксида водорода индуцирование антиоксидантной системы проростков пшеницы и их теплоустойчивости экзогенным путресцином [21]. При этом эффекты транзиторного повышения содержания пероксида водорода и последующего увеличения активности супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в корнях проростков, обработанных путресцином, оказались зависимыми от поступления кальция в цитозоль [22]. Как известно, NO как сигнальный посредник находится в тесном функциональном взаимодействии с активными формами кислорода (**АФК**) и ионами кальция [23].

Цель работы – изучить влияние путресцина на синтез оксида азота по окислительному и восстановительному путям и возможное участие NO в развитии теплоустойчивости проростков, индуцируемой обработкой этим полиамином. Также исследовали влияние кальциевого гомеостаза на синтез NO в корнях проростков и возможные связи между изменениями содержания NO и пероксида водорода при действии путресцина.

МЕТОДИКА

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала обеззараживали 6%-ным пероксидом водорода в течение 30 мин и проращивали в темноте в течение 4 сут на очищенной водопроводной воде при температуре 18–20°C. Затем в среду инкубации корней добавляли путресцин (в конечной концентрация 1 мМ) и выдерживали проростки в течение 24 ч. Оптимальная концентрация путресцина, при которой наблюдалось максимальное повышение теплоустойчивости проростков, была выбрана ранее [21].

При изучении влияния скавенджера NO PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide – 0.1 мМ), ингибитора диаминоксидазы (**ДАО**) аминогуанидина (1 мМ) [24], ингибитора НР вольфрамата натрия (2 мМ) [23], скавенджера пероксида водорода диметилтиомочевины (**ДМТМ** – 0.15 мМ) [23], а также 0.5 мМ этиленгликоль-бис(2-аминоэтил-эфир)тетрауксусной кислоты (**ЭГТА** – хелатор внеклеточного кальция) и 0.2 мМ неомицина – ингибитора образования инозитол-1,4,5-фосфата в реакции, катализируемой фосфолипазой С [22], инкубация корней в растворах составляла 26 ч. При оценке комбинированного действия путресцина и антагонистов сигнальных посредников последние вносили в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее путресцина. Концентрации указанных соединений, максимально модулирующие изучаемые эффекты, но не проявляющие видимого токсического действия, выбирали на основании предварительных опытов.

Биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны по сравнению с другими органами проростка к действию экзогенных соединений и повреждающего прогрева [21, 22].

Содержание оксида азота в корнях определяли с использованием реактива Грисса по методу, описанному в работе [25], с незначительными модификациями, подробно изложенными ранее [26].

Содержания пероксида водорода определяли с использованием ферротиоцианатного метода [27].

Активность ДАО (КФ 1.4.3.6) в корнях определяли по количеству Δ^1пирролина, образующегося при окислении путресцина, с использованием нингидринового метода [28] с некоторыми модификациями. Растительный материал гомогенизировали на льду в 0.05 М K, Na-фосфатном буфере, pH 7.8. Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g на центрифуге MPW 350R ("MPW MedInstruments", Польша) при температуре 2–4°C. В пробирку вносили 3.0 мл реакционной смеси, содержащей 10 мкМ путресцин и 0.1 мкМ пиридоксальфосфат, приготовленные на 0.05 мМ фосфатном буфере, pH 7.8. Реакцию начинали добавлением 0.5 мл супернатанта растительного материала, смесь инкубировали в водяном термостате при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 10%-ной ТХУ, смесь снова центрифугировали в течение 7 мин при 10000 g. В реакционные пробирки вносили по 1 мл супернатанта, добавляли по 1 мл нингидринового реактива, содержащего 250 мг нингидрина и 37.6 мг гидриндантина, растворенных в 10 мл смеси из ледяной уксусной кислоты и 6 М *о*-фосфорной кислоты в соотношении 3:2. После этого в смесь добавляли по 1.5 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивали и кипятили на водяной бане в течение 30 мин для проявления окрашивания. Смесь затем охлаждали и измеряли оптическую плотность (**ОП**) на спектрофотометре СФ-46 ("ЛОМО", Россия) при 510 нм. Измерения проводили относительно контрольной пробы с идентичным набором реактивов и супернатантом, предварительно инактивированным 10-минутным нагревом на кипящей водяной бане. Активность фермента выражали в мкмоль Δ^1пирролина/(г сырой массы × ч).

Активность НР (КФ 1.7.1.1) определяли *in vitro* по количеству образующегося продукта реакции нитрита [29]. Растительный материал гомогенизировали на льду в 0.05 М K, Na-фосфатном буфере, pH 7.8, гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 4000 g при температуре 2–4°C. К 3 мл супернатанта добавляли по 0.5 мл 0.1 М KNO_3 и 5 мМ НАДН. В контрольную пробу вместо НАДН добавляли 0.5 мл дистиллированной воды. Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин, после чего останавливали добавлением 0.5 мл ледяной уксусной кислоты. Для осаждения белков пробы центрифугировали 10 мин при 8000 g. К 3 мл супернатанта добавляли 3 мл 1%-ного реактива Грисса в 12%-ной уксусной кислоте. Через 30 мин измеряли ОП раствора при 527 нм. Активность фермента выражали в мкмоль нитрита/(г сырой массы ч).

Для определения продуктов пероксидного окисления липидов (**ПОЛ**), реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно малоновый диальдегид, **МДА**), через 1 сут после повреждающего прогрева проростков в водяном ультратермостате при температуре 45.0 ± 0.1°C в течение 10 мин, корни гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0.25%-ную 2-тиобарбитуровую кислоту в 10%-ной ТХУ. Гомогенат помещали в кипящую баню на 30 мин, затем охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 g. ОП супернатанта определяли при 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое поглощение) [30].

Для определения теплоустойчивости проростки всех вариантов после повреждающего прогрева переносили на очищенную водопроводную воду. Через 3 сут оценивали относительное количество выживших проростков, к которым относили проростки, не имеющие признаков некроза на листьях и сохраняющие способность к росту.

Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме случаев, оговоренных специально, обсуждаются различия между вариантами, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка проростков пшеницы путресцином вызывала значительное повышение содержания оксида азота в корнях уже через 0.5 ч после ее начала (рис. 1). Через 1 ч количество NO в варианте с путресцином превышало соответствующую величину контроля на 73%. Однако уже к 2 ч инкубации в присутствии путресцина содержание оксида азота в корнях проростков опытного варианта заметно снижалось, а через 4 и 24 ч не отличалось от контроля.

Одним из возможных ферментов, задействованных в синтезе NO по окислительному пути, считается ДАО [31]. Добавление путресцина в среду приводило к быстрому увеличению активности ДАО в корнях проростков (рис. 2а), заметный эффект наблюдался уже через 15 мин действия полиамина. Максимальные значения активности фермента, которые превышали величины контроля почти в 2 раза, наблюдались через 1 ч после начала обработки проростков путресцином. В дальнейшем активность ДАО в корнях опытного варианта постепенно снижалась, однако и через 24 ч несколько превышала значения в контроле.

В качестве основного фермента, который может катализировать образование NO по восстановительному пути, рассматривается НР [20]. Одна-

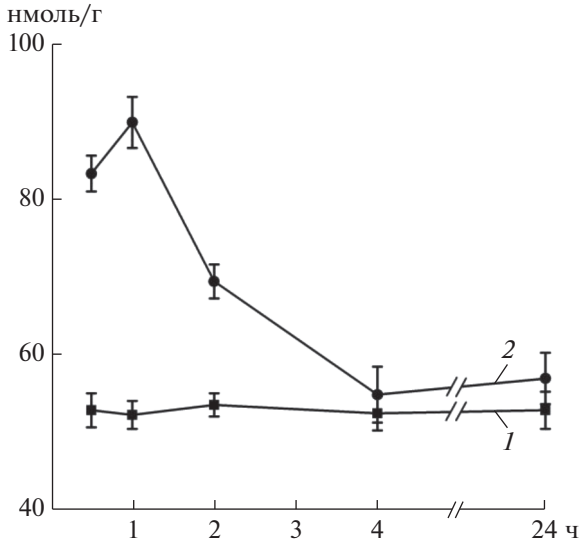


Рис. 1. Динамика содержания оксида азота (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина. *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ).

ко обработка проростков путресцином вызывала снижение активности НР (рис. 2б). Существенный эффект отмечался через 1–4 ч после начала инкубации на среде с добавлением полиамина, а через 24 ч значения активности фермента приближались к величинам контроля.

Обработка проростков ингибитором ДАО аминогуанидином уменьшала активность фермента и полностью нивелировала ее повышение, вызываемое путресцином (рис. 3). Поскольку, как отмечалось, оксид азота, АФК и ионы кальция находятся в тесных функциональных связях друг с другом [23], исследовали влияние скавенджера пероксида водорода ДМТМ и кальциевых антагонистов на активность ДАО в корнях проростков пшеницы, обработанных путресцином. Установлено, что обработка ДМТМ лишь незначительно уменьшала происходящее под влиянием путресцина повышение активности ДАО (рис. 3). В то же время под влиянием как ЭГТА, так и неомицина, отмечалось полное устранение вызываемого путресцином повышения активности ДАО (рис. 3).

Характер изменения содержания NO в корнях проростков пшеницы под влиянием исследуемых модуляторов совпадал с таковым для ДАО. Обнаружено, что обработка проростков аминогуанидином, ингибирующим ДАО и NO-синтазу (ферменты окислительного пути синтеза NO), вызывала уменьшение содержания оксида азота в корнях (рис. 4). При комбинированном действии на проростки путресцина и аминогуанидина этот ингибитор полностью устранял повышение содержания NO, вызываемое действием полиамина. Обработка проростков ингибитором НР вольфраматом натрия почти не влияла на количество оксида азота в корнях и очень слабо уменьшала вызываемый путресцином эффект усиления генерации NO клетками корней (рис. 4).

Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин сами по себе практически не влияли на содержание оксида азота в корнях, однако полностью устраняли эффект увеличения количества NO в корнях в присутствии путресцина (рис. 4).

Антиоксидант ДМТМ не влиял на содержание оксида азота в корнях и лишь частично снимал вызываемое путресцином повышение количества

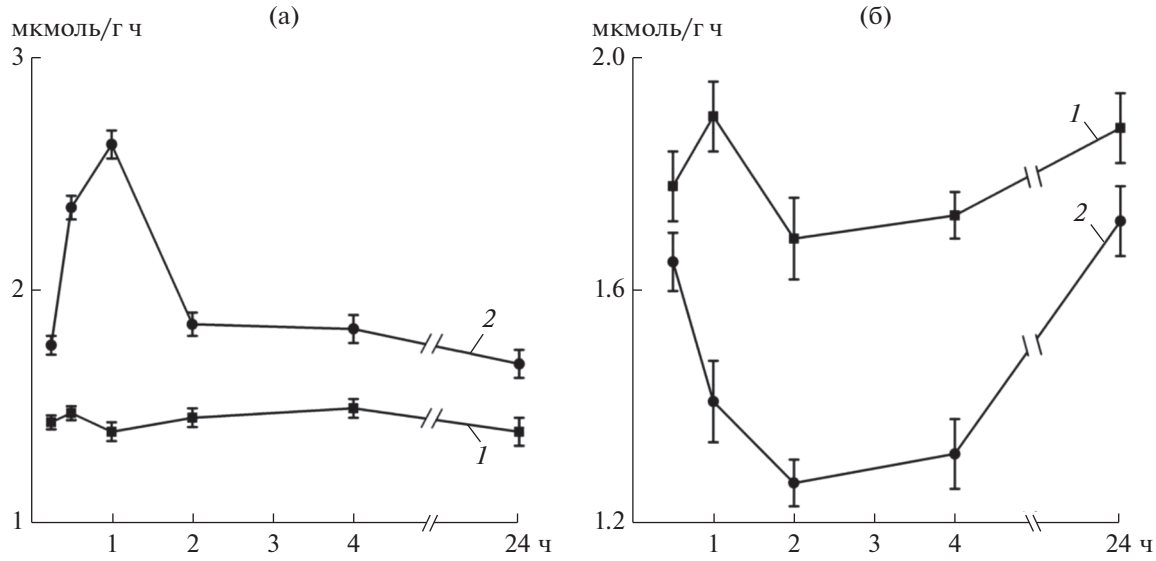


Рис. 2. Динамика активности ДАО ((а), мкмоль Δ^1пирролина/г сырой массы × ч) и НР ((б), мкмоль NO_2^-/г сырой массы × ч) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина. *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ).

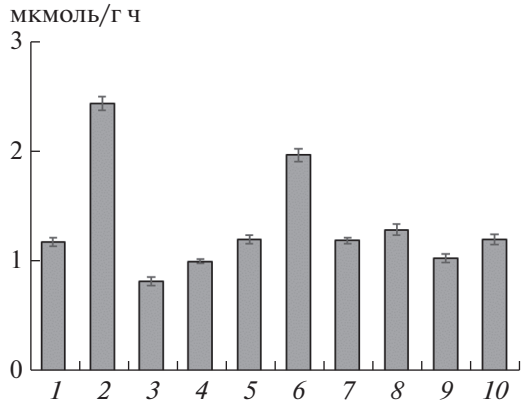


Рис. 3. Активность ДАО (мкмоль Δ^1пирролина/г сырой массы × ч) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина, аминогуанидина, ДМТМ и модуляторов кальциевого гомеостаза. *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – аминогуанидин (1 мМ); *4* – путресцин (1 мМ) + аминогуанидин (1 мМ); *5* – ДМТМ (0.15 мМ); *6* – путресцин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); *7* – ЭГТА (0.5 мМ); *8* – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ); *9* – неомицин (0.2 мМ); *10* – путресцин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ). Активность ДАО определяли через 1 ч после начала инкубации проростков на среде с путресцином и/или через 3 ч после начала обработки другими соединениями.

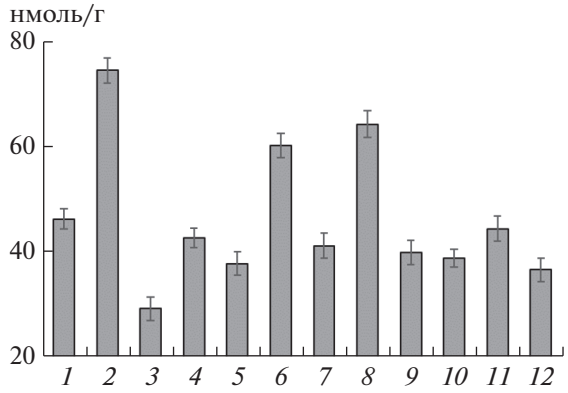


Рис. 4. Содержание оксида азота (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина, аминогуанидина, вольфрамата натрия, ДМТМ и модуляторов кальциевого гомеостаза. *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – аминогуанидин (1 мМ); *4* – путресцин (1 мМ) + аминогуанидин (1 мМ); *5* – вольфрамат натрия (2 мМ); *6* – путресицн (1 мМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); *7* – ДМТМ (0.15 мМ); *8* – путресцин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); *9* – ЭГТА (0.5 мМ); *10* – путресцин (1 мМ) + + ЭГТА (0.5 мМ); *11* – неомицин (0.2 мМ); *12* – путресцин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ). Содержание NO определяли через 1 ч после начала инкубации проростков на среде с путресцином и/или через 3 ч после начала обработки другими соединениями.

NO в корнях (рис. 4). В то же время под влиянием скавенджера оксида азота PTIO происходило практически полное устранение эффекта повышения содержания пероксида водорода в корнях проростков в присутствии путресцина (рис. 5). В варианте с обработкой корней только PTIO содержание H_2O_2 почти не отличалось от контроля. Таким образом, происходящее при обработке проростков путресцином повышение содержания пероксида водорода в корнях зависело от их NO-статуса. Ранее в идентичных экспериментальных условиях было обнаружено устранение эффектов вызываемого путресцином повышения содержания H_2O_2 в корнях проростков при их обработке антагонистами кальция – ЭГТА и неомицином [22].

Обработка путресцином индуцировала развитие теплоустойчивости, что выражалось в уменьшении проявления окислительного стресса, регистрируемого по накоплению продукта ПОЛ МДА, и повышении выживания проростков через 3 сут после повреждающего воздействия (рис. 6). Воздействие на проростки PTIO не оказывало влияния на уровень ПОЛ и теплоустойчивость, но полностью снимало защитные эффекты путресцина. При обработке проростков ингибитором ДАО и NO-синтазы аминогуанидином существенных изменений содержания МДА в корнях проростков после теплового стресса не наблюдали. При этом аминогуанидин частично снимал эффект защиты от окислительного стресса, вызываемый путресцином. Выживание проростков в вариантах с аминогуанидином и его комбинацией с путресцином не отличалось от контроля (рис. 6). Таким образом, этот ингибитор устранял стресс-протекторное действие путресцина. Под влиянием ингибитора НР вольфрамата натрия содержание МДА в корнях проростков, как и их выживание после повреждающего нагрева, не изменялось.

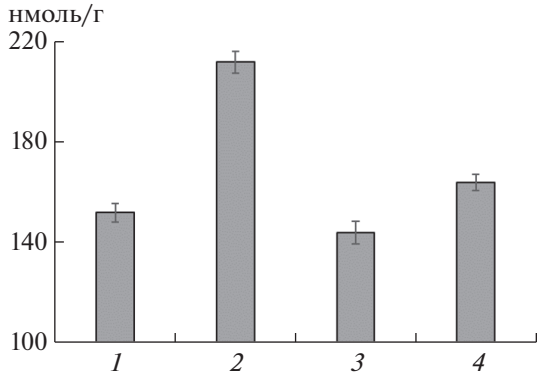


Рис. 5. Содержание пероксида водорода (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии путресцина и PTIO. *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – PTIO (0.1 мМ); *4* – путресцин (1 мМ) + + PTIO (0.1 мМ). Содержание H_2O_2 определяли через 2 ч после начала инкубации проростков на среде с путресцином и/или через 4 ч после начала обработки PTIO.

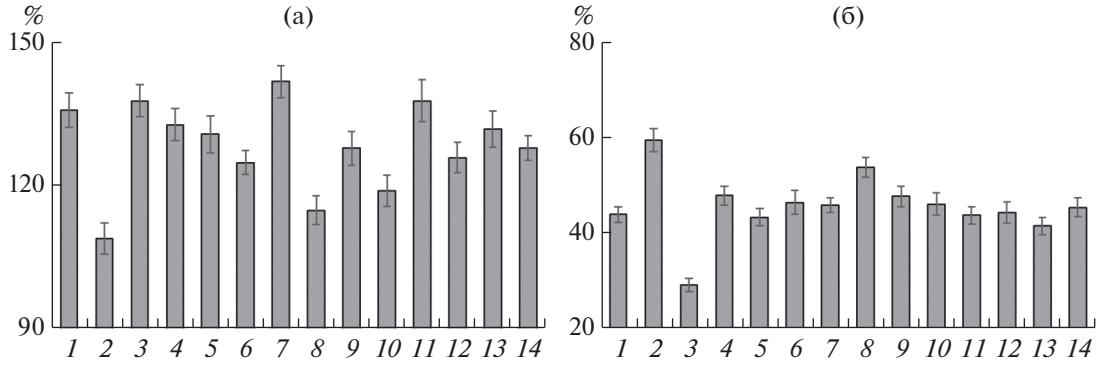


Рис. 6. Содержание МДА (%, к контролю без прогрева) в корнях (а) и выживание (%) проростков пшеницы (б) после повреждающего прогрева: *1* – контроль; *2* – путресцин (1 мМ); *3* – PTIO (0.1 мМ); *4* – путресцин (1 мМ) + PTIO (0.1 мМ); *5* – аминогуанидин (1 мМ); *6* – путресцин (1 мМ) + аминогуанидин (1 мМ); *7* – вольфрамат натрия (2 мМ); *8* – путресцин (1 мМ) + вольфрамат натрия (2 мМ); *9* – ДМТМ (0.15 мМ); *10* – путресцин (1 мМ) + ДМТМ (0.15 мМ); *11* – ЭГТА (0.5 мМ); *12* – путресцин (1 мМ) + ЭГТА (0.5 мМ); *13* – неомицин (0.2 мМ); *14* – путресцин (1 мМ) + неомицин (0.2 мМ). Содержание МДА определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 сут после повреждающего прогрева.

При этом в присутствии указанного ингибитора в значительной степени сохранялись эффекты защиты от окислительного стресса и повышения выживания проростков после повреждающего прогрева, вызываемые путресцином (рис. 6).

Обработка антиоксидантом ДМТМ сама по себе немного уменьшала вызываемое прогревом накопление МДА в корнях проростков, хотя этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$ (рис. 6). Также в присутствии ДМТМ, по крайней мере частично, сохранялся эффект защиты клеток корней от окислительного стресса, индуцированный путресцином. При этом, однако, ДМТМ, не влияя сам по себе на выживание проростков после теплового стресса, полностью устранял положительный эффект путресцина (рис. 6).

Антагонисты кальция ЭГТА и неомицин, сами по себе не оказывая влияния на накопление продукта ПОЛ МДА при тепловом стрессе, частично снимали эффект предотвращения развития окислительного стресса, вызываемый путресцином. Также эти антагонисты полностью устраняли повышение выживания проростков, обработанных путресцином. При этом сами по себе антагонисты кальция существенного влияния на теплоустойчивость проростков не оказывали (рис. 6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали об участии NO как сигнального посредника в развитии теплоустойчивости проростков пшеницы под влиянием экзогенного путресцина. На это указывало транзиторное увеличение содержания оксида азота в корнях при их инкубации в присутствии путресцина и устранение его стресс-протекторного действия скавенджером NO PTIO. Есть основания полагать, что одной из основных причин повышения содержания NO в клетках корней в присутствии путресцина является увеличение активности ДАО, которое было особенно заметным в течение первого часа после начала воздействия полиамина (рис. 2). Механизм образования NO в клетках растений под влиянием ДАО остается не известным [8]. Однако этот фермент рассматривается в качестве одной из составляющих ферментативной системы синтеза оксида азота в растительных клетках [31]. Вызываемое путресцином повышение содержания оксида азота устранялось ингибитором ДАО аминогуанидином (рис. 4). Как уже отмечалось, аминогуанидин обладает способностью наряду с ДАО ингибировать NO-синтазу [24]. Наличие этого фермента у высших растений не доказано молекулярно-генетическими методами. Предполагается, что наземные растения во время эволюции утратили ген, гомологичный NO-синтазе животных [32]. Однако не исключено, что у высших растений в пероксисомах имеются белки, отличные от NO-синтазы, но способные генерировать NO, используя L-аргинин в качестве субстрата. Следует отметить, что в качестве основных субстратов для образования NO в окислительном пути в настоящее время рассматривают не только L-аргинин, но и полиамины, в том числе диамин – путресцин, окисление которого катализируется ДАО [33]. Таким образом, данные ингибиторного анализа в нашем случае позволяют говорить об основном вкладе окислительного пути синтеза NO, который угнетается аминогуанидином.

С другой стороны, активность НР в корнях проростков в условиях наших экспериментов под влиянием путресцина не только не повышалась, а заметно снижалась (рис. 2б). Это указывало на перераспределение в присутствии экзогенного путресцина вклада окислительного и восстановительного путей синтеза NO в пользу первого. Как отмечалось, в работе [18] была установлена способность различных полиаминов ингибировать

активность НР. Такой эффект полиаминов имеет сходство с действием одного из основных субстратов окислительного пути синтеза NO у растений – L-аргинина. Ранее был показан эффект угнетения зависимого от экзогенных нитратов синтеза NO в корнях проростков пшеницы при их обработке L-аргинином [34]. Данные настоящей работы, также полученные на корнях проростков пшеницы, указывают на сходство ингибирующего влияния L-аргинина и путресцина на активность НР и, как следствие, на образование NO по восстановительному пути. При этом путресцин оказывает сильное активирующее влияние на ДАО и, возможно, другие ферментативные системы, обеспечивающие образование оксида азота по окислительному пути и увеличение его количества в корнях.

Следует отметить, что модулировать содержание оксида азота могут различные полиамины, при этом их влияние на ферментативные системы, синтезирующие NO, может быть достаточно специфичным. Например, на растениях томатов показано повышение содержания NO в листьях в условиях гипотермии под влиянием спермина и спермидина, но не путресцина [35]. При этом повышение содержания оксида азота при обработке растений спермином и спермидином было связано с увеличением активности НР.

Другим важным участником сигнальной сети, задействованной в реализации эффектов экзогенных полиаминов, является пероксид водорода. Ранее было показано, что при обработке проростков скавенджером H_2O_2 ДМТМ не происходило активации антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы), вызываемой путресцином [21]. В настоящей работе установлено, что вызываемое путресцином усиление синтеза пероксида водорода в значительной степени зависит от наличия в клетках оксида азота и угнетается его скавенджером PTIO (рис. 5). С другой стороны, образование NO, усиливающееся при обработке проростков путресцином, лишь частично уменьшалось в присутствии скавенджера пероксида водорода ДМТМ. Динамика увеличения содержания NO и H_2O_2 в корнях проростков пшеницы была похожей. Повышенное количество обоих посредников отмечалось в течение первых двух часов после начала инкубации корней в присутствии путресцина. Однако максимум содержания NO был зарегистрирован через 1 ч (рис. 1), а пероксида водорода через 2 ч после начала воздействия путресцина [21]. Можно полагать, что образование двух посредников взаимозависимое, но не исключено, что оксид азота в сигнальном пути все же находится выше пероксида водорода. H_2O_2 может быть продуктом реакции окисления путресцина под действием ДАО. Ранее было показано уменьшение содержания пероксида водорода в корнях, обработанных путресцином, в присутствии аминогуанидина. С другой стороны, стимулируемое путресцином накопление пероксида водорода угнеталось и ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом [21]. Возможно, что при обработке корней путресцином сначала происходила активация ДАО, за счет которой формируется начальный, необходимый для запуска сигнальных процессов пул пероксида водорода. В начальный период такого воздействия, усиливалась и генерация NO. Не исключено, что поддержание достаточно высокого пула H_2O_2 при действии путресцина в дальнейшем может быть обусловлено повышением активности НАДФН-оксидазы. Известно, что активность этого фермента может повышаться под влиянием NO [36], причем такой эффект может быть опосредован NO-индуцированным изменением концентрации кальция в цитозоле [13].

Как отмечалось, ионы кальция находятся в тесном функциональном взаимодействии как с NO, так и с АФК. В условиях наших экспериментов эффект повышения содержания оксида азота в корнях проростков, вызываемый путресцином, устранялся двумя используемыми кальциевыми антагонистами – ЭГТА (хелатор внеклеточного кальция) и неомицином (ингибитор фосфолипазы С, с участием которой образуется инозитол-1,4,5-фосфат, открывающий внутриклеточные кальциевые каналы) (рис. 4). Эти же антагонисты кальция снимали эффект активации путресцином ДАО (рис. 3).

Влияние кальция на активность ДАО у растений исследовано слабо. Хотя на ряде растительных объектов зарегистрировано повышение ее активности при обработке экзогенным Ca^{2+} [37, 38]. ДАО локализована в клеточных стенках [39]. Возможно, что в ее активации задействован кальций, попадающий в апопласт при усилении путресцином его выхода из клеток [10]. Кроме того, известна способность полиаминов вытеснять кальций из его комплексов с пектиновыми веществами клеточных стенок [40]. Таким образом, вероятно, как начальные эффекты, вызываемые экзогенным путресцином, так и последующие, обусловленные вовлечением различных посредников, являются кальций-зависимыми. Ранее в идентичных экспериментальных условиях было установлено, что вызываемое путресцином повышение содержания пероксида водорода в корнях пшеницы и последующая активация антиоксидантной ферментативной системы являются кальций-зависимыми процессами [22].

* * *

Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что наиболее ранними

процессами, развивающимися при действии путресцина на клетки корней, являются изменения кальциевого гомеостаза и связанная с ними активация ДАО. С участием ДАО происходит синтез пероксида водорода и оксида азота. Эти посредники также могут реализовать свои сигнальные эффекты при участии кальция. Есть основания полагать, что активация сигнальных каскадов, главными компонентами которых являются Ca^{2+}, NO и АФК, индуцирует протекторные системы, обеспечивающие развитие теплоустойчивости. Одной из них является антиоксидантная система. Об этом свидетельствуют данные о зависимости индуцируемого путресцином повышения активности антиоксидантных ферментов [21, 22] и снижения окислительных повреждений (рис. 6а) от кальциевого гомеостаза, образования АФК с участием ДАО и НАДФН-оксидазы, а также синтеза NO. Таким образом, биогенные полиамины (в частности, путресцин) следует рассматривать в качестве достаточно мощных модуляторов функционирования сигнальных сетей и активаторов стресс-протекторных реакций растений. В связи с этим в ближайшей перспективе практический интерес может представлять как применение экзогенных полиаминов в растениеводстве, так и трансформация растений генами ферментов синтеза полиаминов [41].

Авторы выражают благодарность за поддержку проекту Czech Republic Development Cooperation “Платформа AgriSciences для развития науки в высших учебных заведениях Украины”, который позволил начать это исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gupta K., Dey A., Gupta B.* // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 2015–2036.
2. *Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J.* // Plant Sci. 1999. V. 140. P. 103–125.
3. *Gill S.S., Tuteja N.* // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. № 1. P. 26–33.
4. *Saha J., Brauer E.K., Sengupta A., Popescu S.C., Gupta K., Gupta B.* // Front. Environ. Sci. 2015. V. 3. Art. 21. https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00021
5. *Sagor G.H., Berberich T., Takahashi Y., Niitsu M., Kusano T.* // Transgenic Res. 2013. V. 22. № 3. P. 595–605.
6. *Кузнецов Вл.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И.* // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 5. С. 658–683.
7. *Sobieszczuk-Nowicka E., Legocka J.* // Plant Biol. (Stuttg). 2014. V. 16. № 2. P. 297–305.
8. *Pal M., Szalai G., Janda T.* // Plant Sci. 2015. V. 237. P. 16–23.
9. *Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M., Casero R.A.Jr.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. 95. № 19. P. 11140–11145.
10. *Pottosin I., Shabala S.* // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. Art. 154. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00154
11. *Bose J., Pottosin I.I., Shabala S.S., Palmgren M.G., Shabala S.* // Front. Plant Sci. 2011. V. 2. Art. 85. https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00085
12. *Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В.* // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 2. С. 163–178.
13. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В.* // Ukr. Biochem. J. 2014. V. 86. № 4. P. 18–35.
14. *Kohli S.K., Handa N., Gautam V., Bali S., Sharma A., Khanna K., Arora S., Thukral K.A., Ohri P., Karpets Yu., Kolupaev Yu., Bhardwaj R.* // Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. / Eds. M.I.R. Khan, N.A. Khan. Singapore: Springer Nature Pte Ltd, 2017. P. 185–214.
15. *Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S., Scherer G.F.E.* // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. № 3. P. 346–354.
16. *Yang B., Wu J., Gao F., Wang J., Su G.* // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 79. P. 41–47.
17. *Wimalasekera R., Villar C., Beguma T., Scherer G.F.E.* // Mol. Plant. 2011. V. 4. P. 663–678.
18. *Rosales E.P., Iannone M.F., Groppa M.D., Benavides M.P.* // Amino Acids. 2012. V. 42. № 2–3. P. 857–865.
19. *Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A.* // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. № 4. P. 864–885.
20. *Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., et al.* // AoB Plants. 2013. V. 5. Art. pls052. https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052
21. *Kolupaev Yu.E., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Horielova E.I.* // Ukr. Biochem. J. 2019. V. 91. № 6. P. 103–111.
22. *Kolupaev Yu.E, Kokorev A.I., Shkliarevskyi M.A.* // Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya. Tomsk State University Journal of Biology. 2020. V. 51. P. 105–122. https://doi.org/10.17223/19988591/51/6
23. *Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 95–102.
24. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И.* // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 4. С. 521–531.
25. *Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B.* // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. № 422. P. 3223–3228.
26. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А.* // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 1. С. 72–78.
27. *Sagisaka S.* // Plant Physiol. 1976. V. 57. №. 2. P. 308–309.
28. *Naik B.I., Goswami R.G., Srivastava S.K.* // Anal. Biochem. 1981. V. 111. № 1. P. 146–148.
29. *Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Пономарева А.А., Викторова Л.В., Минибаева Ф.В.* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 4. С. 512–520.
30. *Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В.* // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 369–375.
31. *Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F.* // Mol. Plant. 2001. V. 4. № 4. P. 663–678.
32. *Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z. et al.* // Sci. Signal. 2016. V. 9. № 417.

P. re2.
https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403
33. *Gupta K.J., Hancock J.T., Petrivalsky M., Kolbert Z., Lindermayr C., Durner J., et al.* // New Phytol. 2020. V. 225. № 5. P. 1828–1834.
34. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Швиденко Н.В., Ястреб Т.О.* // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 6. С. 472–480.
35. *Diao Q., Song Y., Shi D., Qi H.* // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Art. 203.
https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00203
36. *Tewari R.K., Hahn E.J., Paek K.Y.* // Plant Cell Rep. 2008. V. 27. № 3. P. 563–573.
37. *Piterková J., Luhová L., Zajoncová L., Šebela M., Petřivalský M.* // Plant Protect. Sci. 2012. V. 48. № 2. P. 53–64.
38. *Wang K., Xu F., Cao S., Wang H., Wei Y., Shao X., Zhou W., Zheng Y.* // Postharvest Biology and Technology. 2019. V. 152. № 2. P. 111–117.
39. *Шарова Е.И., Медведев С.С.* // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 1. С. 3–18.
40. *Messiaen J., Van Cutsem P.* // Planta. 1999. V. 208. № 2. P. 247–256.
41. *Prabhavathi V.R., Rajam V.R.* // Plant Biotechnol. 2007. V. 24. № 3. P. 273–282.

The Role of NO Synthesis Modification in the Implementation of the Protective Effect on Wheat Seedlings under Heat Stress by Putrescine

Yu. E. Kolupaev[a], *, A. I. Kokorev[a], M. A. Shkliarevskyi[a], A. A. Lugovaya[a], Yu. V. Karpets[a], and O. E. Ivanchenko[b]

[a] *Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, 62483 Ukraine*
[b] *Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, 49600 Ukraine*
**e-mail: plant.biology.knau@gmail.com*

The role of nitric oxide and its functional relationships with reactive oxygen species (**ROS**) and calcium in the realization of stress-protective effects of polyamine putrescine on wheat seedlings during hyperthermia was studied. A 24-hour treatment of seedlings with 1 mM putrescine caused a rapid and transient increase in the NO content in roots with a maximum 1 h after its onset. Wherein, a twofold increase in the activity of diamine oxidase (**DAO**) and a decrease in the activity of nitrate reductase in roots by 25–30% were noted. The DAO inhibitor aminoguanidine completely eliminated the increase in the NO content caused by putrescine. Treatment of seedlings with calcium antagonists EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) and neomycin also eliminated the increase in DAO activity and NO content. The nitric oxide scavenger PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) completely neutralized the effect of increasing the content of hydrogen peroxide in roots of wheat seedlings when they were treated with putrescine. At the same time, treatment with a hydrogen peroxide antagonist dimethylthiourea only slightly reduced the effect of NO content increasing in roots caused by putrescine. Antagonists of NO, ROS, and calcium eliminated the protective effect of putrescine under heat stress, which was determined by the intensity of LPO and seedling survival. A conclusion was made about the role of nitric oxide synthesized by the oxidative pathway and its functional interaction with ROS and calcium ions in the realization of the stress-protective effect of putrescine on plant objects.

Keywords: putrescine, nitric oxide, diamine oxidase, nitrate reductase, reactive oxygen species, calcium, heat resistance, *Triticum aestivum*

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 291–302

УДК 577.112

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ Е6 И Е7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ТИПА: ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА *in vivo*

© 2021 г. М. Е. Субботина[1, 2, *], Т. М. Грунина[1, 2], О. В. Сергиенко[2], Н. В. Елкина[3], Д. С. Елкин[3], М. В. Новикова[3], П. Б. Копнин[3], С. В. Винокурова[3]

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью" Федерального медико-биологического агенства, Москва, 119121 Россия*

[2]*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии", Москва, 127550 Россия*

[3]*Научно-исследовательский институт канцерогенеза, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия*

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

Поступила в редакцию 09.11.2020 г.
После доработки 04.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Синтезом в гетерологичной системе экспрессии в *Escherichia coli* получены препараты рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD, представляющих собой антигены Е6 и Е7 вируса папилломы человека высокооонкогенного 16 типа (**ВПЧ16**), соединенные с помощью глицин-серинового спейсера с целлюлозосвязывающим доменом (**CBD**) из *Anaerocellum thermophilum*. Разработана простая и эффективная одностадийная технология выделения и очистки рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD. Наличие антигенных свойств у полученных белковых препаратов подтверждено методом вестерн-блоттинга. Разработаны три варианта иммуногенных композиций с рекомбинантными белками Е6-CBD, Е7-CBD и схема 3-этапной иммунизации, проведена оценка иммуногенности на мышах линии BALB/c, изучен противоопухолевый эффект иммуногенных композиций на экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ16-ассоциированными опухолями. Показано, что Е6-CBD и Е7-CBD являются высокоиммуногенными и обладают противоопухолевым эффектом *in vivo*. Для достижения наибольшей эффективности в составе иммуногенной композиции необходимо присутствие обоих белков Е6-CBD и Е7-CBD. Полученные рекомбинантные антигены Е6-CBD и Е7-CBD ВПЧ16 могут использоваться в двух направлениях: 1) в клинической практике – в качестве основных специфических компонентов терапевтических вакцин для лечения ВПЧ16-ассоциированных неопластических поражений различных локализаций (рак шейки матки, карциномы аногенитального тракта, ротоглотки); 2) в диагностике – при разработке диагностических наборов для выявления антител к онкобелкам Е6 и Е7 у пациентов с ВПЧ16-ассоциированными злокачественными новообразованиями.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, онкогенные белки Е6 и Е7, рак шейки матки, терапевтические вакцины, иммуногенность, противоопухолевый эффект

DOI: 10.31857/S0555109921030120

Вирусы папилломы человека (**ВПЧ**) представляют собой семейство двухцепочечных кольцевых ДНК-содержащих вирусов, которые являются интраэпителиальными патогенами и вызывают развитие как доброкачественных, так и злокачественных новообразований (рак шейки матки (**РШМ**), рак аногенитальной области, носоглотки, головы и шеи) [1, 2]. За развитие более 80% всех цервикальных карцином ответственны ВПЧ высокоонкогенных типов 16 и 18 [3, 4]. Основной путь передачи ВПЧ – половой, но возможны также вертикальный (от инфицированной матери плоду) и горизонтальные пути передачи вируса, в том числе контактно-бытовой [5, 6]. На ранних стадиях ВПЧ-инфекция зачастую протекает бессимптомно, неспецифические клинические признаки появляются лишь на поздних стадиях, что затрудняет выявление и проведение своевременного лечения ВПЧ-ассоциированных онкологических заболеваний.

При ВПЧ-инфекции основную роль в иммортализации, злокачественной трансформации клеток и поддержании их трансформированного фенотипа играют онкобелки Е6 и Е7 ВПЧ [7]. Они облада-

ют высокой консервативностью, конститутивной экспрессией в опухолевых и предраковых клетках и не вызывают развитие аутоиммунных реакций, поскольку являются чужеродными белками для человека. Благодаря перечисленным свойствам белки Е6 и Е7 ВПЧ являются наиболее перспективными мишенями для создания терапевтических вакцин против ВПЧ-индуцированных онкологических заболеваний [1, 8].

На сегодняшний день ни одна из терапевтических вакцин против ВПЧ не одобрена авторитетными организациями (FDA, ВОЗ) к использованию в клинической практике. Рекомендованы к применению лишь профилактические вакцины: квадривалентная и нонавалентная вакцины Gardasil® (“Merck Sharp&Dohme Corp.”, США) и бивалентная вакцина Cervarix® (“GlaxoSmithKline Biologicals”, Бельгия), направленные на формирование ВПЧ-нейтрализующих антител. В России вакцинация против ВПЧ не входит в национальный календарь профилактических прививок. К сожалению, успешность профилактической вакцинации определяется отсутствием или наличием инфицированности ВПЧ: у индивидов, которые были инфицированы ВПЧ до проведения вакцинации, профилактические вакцины не могут предотвратить развитие неопластических изменений и рака, а также вертикальную и горизонтальную передачу вируса от инфицированных родителей детям [9]. Таким образом, существенная доля населения не защищена от ВПЧ-инфекций, поэтому разработка терапевтических вакцин для стимуляции цитотоксического Т-клеточного ответа, направленного на уничтожение ВПЧ-инфицированных и малигнизированных клеток, представляется крайне актуальной.

В настоящее время ряд кандидатных терапевтических вакцинных композиций, предназначенных для лечения ВПЧ-ассоциированных предраковых поражений и опухолевых заболеваний, в том числе РШМ, проходит доклинические и клинические испытания [10]. В основном в состав иммуногенных композиций входит онкобелок Е7, так как он лучше охарактеризован в доклинических исследованиях [11]. Однако онкобелок Е6 не менее перспективен – в экспериментах Накагава с соавт. [12] излечение от ВПЧ-инфекции коррелировало с цитотоксическим Т-клеточным ответом, индуцированным онкобелком Е6.

Помимо терапевтического применения, мишени Е6 и Е7 могут также использоваться в диагностике ВПЧ-ассоциированных заболеваний: пациентки с РШМ имеют более высокие уровни анти-Е6- и анти-Е7-антител, чем женщины с нормальной цитологической картиной или низкой степенью тяжести дисплазии шейки матки [13].

Одним из наиболее простых способов получения рекомбинантных антигенов в больших количествах с целью разработки иммуногенных композиций является клонирование гена в прокариотический экспрессионный вектор и получение белка в *Escherichia coli*. Показано, что рекомбинантный белок Е7, полученный микробиологическим синтезом, сохраняет антигенные свойства нативного белка, распознаваемого сыворотками от ВПЧ-инфицированных субъектов, и поэтому он используется в серологических исследованиях. Получение белка Е7 в растворимой форме не представляет собой значительную сложность [14–16]. Напротив, белок Е6 имеет тенденцию образовывать тельца включения при экспрессии в *E. coli*, по всей видимости, из-за наличия в его составе сильных гидрофобных аминокислотных остатков [17]. Было предложено несколько подходов для преодоления проблем получения рекомбинантного Е6, однако его гидрофобные свойства сохранялись даже при соединении с глутатион-*S*-трансферазой или мальтозосвязывающим белком, что приводило к частичной агрегации белка [18, 19]. В работе [20] проведена успешная очистка белка Е6 двухступенчатым хроматографическим методом, однако он был стабильным только в щелочной среде (pH 10), что значительно ограничивает его применение [20]. Таким образом, актуальной задачей являлось получение в *E. coli* онкобелков Е6 и Е7 в растворимой форме, сохраняющих стабильность при нейтральных pH.

Цель работы – получение рекомбинантных антигенов Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа в гетерологичной системе экспрессии в *Escherichia coli*, очистка, изучение их иммуногенности и противоопухолевой активности *in vivo* на мышах линии BALB/c.

МЕТОДИКА

Получение плазмидных конструкций, кодирующих антигены Е6 и Е7 ВПЧ16. Нуклеотидные последовательности синтетических генов, кодирующих белки Е6 (GenBank: AYV61474.1) и Е7 (GenBank: AYV61475.1) ВПЧ 16 типа (**ВПЧ16**), оптимизировали с учетом кодонного состава *E. coli* и отсутствия выраженной вторичной структуры мРНК и фланкировали сайтами NcoI и Kpn2I на 5'- и 3'-концах соответственно. Оптимизацию кодонного состава синтетических генов проводили с помощью программы JCat (http://www.jcat.de/), корректировку вторичной структуры транскрибируемой РНК – с помощью веб-сервера DINAMelt (http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two_state_folding).

Синтез генов проведен фирмой “Евроген” (Россия).

Синтетические гены, кодирующие белки Е6 и Е7 ВПЧ16, встраивали по сайтам NcoI и Kpn2I в плазмиду pR1504 (на основе рекомбинантного вектора pQE-6, “Qiagen”, США) под промотором

фага Т7. Полученными генно-инженерными конструкциями трансформировали штамм *E. coli* M15 методом электропорации с использованием аппарата MicroPulser ("Bio-Rad", США). Отбор клонов проводили с использованием антибиотиков – ампициллина (150 мкг/мл) и канамицина (20 мкг/мл). Отобранные клоны культивировали в препаративных количествах, выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее в 1%-ном агарозном геле согласно общепринятым методикам [21]. Размеры полученных продуктов соответствовали расчетным значениям. Правильность нуклеотидных последовательностей клонированных генов подтверждали секвенированием.

Получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков Е6 и Е7 ВПЧ16, содержащих целлюлозосвязывающий домен. Далее гены, кодирующие белки Е6 и Е7, встраивали по сайтам рестрикции BamHI, BglI и BglII в экспрессионные векторы pTT10 (на основе плазмиды pQE-6) и pL650 (на основе плазмиды pR1504) соответственно, содержащие последовательность гена целлюлозосвязывающего домена (**CBD**, cellulose binding domain) из *Anaerocellum thermophilum* и глицин-сериновый спейсер. Полученными плазмидами трансформировали штаммы *E. coli* BL21 [pRep4] и M15 [pRep4] методом электропорации.

Выращивание клеток-продуцентов белков Е6-CBD и Е7-CBD. Культуры трансформированных клеток выращивали в среде LB с добавлением канамицина (20 мг/л) и ампициллина (150 мг/л) при 37°C на ротационной качалке Multitron Standart ("Infors HT", Швейцария) при 180 об./мин до достижения $ОП_{600}$ 0.8–1.0. Синтез белка индуцировали добавлением 0.5 мМ раствора ИПТГ, далее культуру выращивали в течение 6–7 ч при 25°C и центрифугировали в течение 15 мин при 5697 g и 4°C. Биомассу хранили при –20°C.

Выделение и очистка рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD. Размороженную биомассу бактериальных клеток суспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 0.5%-ный Тритон X100, 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид), добавляя его в соотношении не менее чем 1 : 10 (вес/об.), вносили 100 мкг/мл лизоцима, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, обрабатывали на ультразвуковой установке Vibra-Cell ("Sonics", США; 40%-ная амплитуда, дважды по 2 мин на льду) и выдерживали еще в течение 15–20 мин на льду. Смесь центрифугировали при 19650 g в течение 30 мин при 4°C. В супернатанте содержались растворимые клеточные белки в правильной нативной конформации, а белки нерастворимой фракции (в том числе тельца включения) – в осадке. Для дальнейшей очистки белков Е6-CBD и Е7-CBD использовали супернатант.

Используемый метод очистки рекомбинантных белков основан на способности химерных белков с целлюлозосвязывающим доменом специфически связываться с целлюлозосодержащим сорбентом – Perloza MT500. Супернанант, полученный после лизиса 1 г биомассы клеток штамма-продуцента, инкубировали с равным объемом густой суспензии сорбента Perloza MT500 ("Perloza", Чехия), приготовленной в буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 0.1%-ный Тритон X100), в течение не менее 3 ч. Суспензию переносили в хроматографическую колонку и промывали сорбент с иммобилизованным на нем белком 10-кратным объемом того же буфера до падения и стабилизации сигнала УФ-детектора. Затем колонку отмывали от Тритона X-100 10-кратным объемом буфера (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 500 мМ NaCl) до падения и стабилизации сигнала УФ-детектора. В связи с сильной адсорбцией CBD-содержащих белков на матрице целлюлозосодержащего сорбента, элюцию целевых белков проводили 6 М раствором мочевины в 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0. Рефолдинг очищенных белков осуществляли диализом путем понижения концентрации мочевины: 1 сут против 4 М мочевины, фосфатный буфер (pH 7.4), затем против 2.0 М мочевины в том же буфере (pH 7.4), далее 1 сут против фосфатного буфера (pH 7.4) без мочевины при температуре 4°C.

Полученные пробы целевых белов на разных стадиях очистки анализировали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС по Лэммли. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда.

Стерилизующая фильтрация. Стерилизующую фильтрацию полученных растворов белков проводили продавливанием через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0.22 мкм (одноразовая стерильная система "Corning", США) в стерильном боксе. Количественные потери при фильтрации оценивали, измеряя оптическую плотность растворов белков при 280 нм.

Полученные после стерилизации растворы белков Е6-CBD и Е7-CBD переносили в стерильные полипропиленовые пробирки, замораживали и хранили при –20°C.

Изучение стабильности рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD при хранении. Для изучения стабильности образцы рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD (10 мкг белка в 0.25 мл стерильного фосфатного буфера, pH 7.4, в стерильных флаконах) были заложены в трехкратной повторности на хранение при +4°C (рекомендуемая температура хранения препаратов белков). Из заложенных на хранение образцов рекомбинантных белков отбирали пробы в течение 3 месяцев с интервалом в 7 дней. Оценку стабильности полученных проб рекомбинантных белков прово-

дили с помощью электрофоретического анализа в 12%-ном ПААГ по стандартной методике с целью выявления признаков деградации белков.

Вестерн-блоттинг. В работе использовали ВПЧ16-положительные клеточные линии карцином шейки матки SiHa (ATCC HTB-35™) и Ca Ski (ATCC CRL-1550™). Клетки культивировали в среде DMEM с L-глутамином, содержавшей 10% фетальной бычьей сыворотки, антибиотики пенициллин (50 ед./мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). Культивирование осуществляли в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2.

Для приготовления клеточных лизатов использовали RIPA-буфер (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% ДДС, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мМ NaF) с ингибитором протеаз cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ("Roche", Германия). Концентрацию белков измеряли с использованием BCA-метода Pierce™ BCA Protein Assay Kit, "Thermo Scientific", США). Для разделения белков в 7%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na использовали 40 мкг белка клеточных линий SiHa и Ca Ski и 0.5 мкг рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD. Белки смешивали с буфером для нанесения проб по Лэммли (4% ДДС, 10% β-меркаптоэтанола, 20% глицерина, 0.004% бромфенолового синего, 0.125 М Трис-HCl, pH 6.8) и инкубировали 5 мин при 95°C. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL 0.45 мкм ("GE Healthcare/Life Sciences", США) осуществляли методом полусухого переноса с использованием катодного (6 мМ Трис, 4 мМ *N*-циклогексил-3-аминопропансульфокислота (*N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (**CAPS**), 40%-ный этиловый спирт) и анодного буферов (6 мМ Трис, 4 мМ CAPS, 10%-ный ДДС). Перенос проводили с использованием прибора Trans-Blot Turbo Transfer System ("Bio-Rad", США) в течение 20 мин при постоянном напряжении 25 В и переменном токе до 1 А. Мембрану блокировали в 5%-ном обезжиренном молоке на TBST-буфере (20 мМ Трис, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Твин 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами мыши к белку E6 ВПЧ16 в титре 1 : 200 (sc-460, "Santa Cruz Biotechnology", США), а к белку E7 ВПЧ16 в титре 1 : 500 (sc-65711, "Santa Cruz Biotechnology", США) проводили при 4°C в течение ночи. Инкубацию со вторичными антителами козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена, в титре 1 : 5000 ("Bio-Rad", США) проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Проявляли с использованием субстрата Clarity™ Western ECL Substrate ("Bio-Rad", США) в соответствии с инструкцией производителя.

Создание иммуногенных композиций на основе рекомбинантных антигенов E6-CBD и E7-CBD. На основе полученных рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD были разработаны три варианта иммуногенных композиций, состоящие из одного или двух рекомбинантных антигенов (производятся по независимым технологическим схемам), иммобилизованных на ДЭАЭ-декстране одноцепочечных синтетических олигодезоксирибонуклеотидов CpG в качестве адъюванта и ДЭАЭ-декстрана. Состав иммуногенных композиций представлен в табл. 1.

Экспериментальные животные. В работе использовали самок мышей сингенной инбредной линии BALB/c в возрасте 7–8 нед. весом 18–20 г (n = 60, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России).

Исследование гуморального иммунного ответа. Интактным мышам линии BALB/c (n = 10, опытные группы) трехкратно вводили иммуногенную композицию CBD1 (табл. 1), содержащую рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD, с интервалом в 5 сут. Инъекцию производили одноразовым стерильным инсулиновым шприцом подкожно в холку животного. Объем раствора для введения составлял 150 мкл. Животным контрольной группы (n = 10) по описанной схеме вводили физиологический раствор. Иммунный ответ исследовали через 14 и 42 сут после последней инъекции иммуногенной композиции CBD1. В течение всего эксперимента проводили постоянный мониторинг физиологического состояния экспериментальных животных.

По истечении 14 и 42 сут с момента последней инъекции лабораторных животных опытных и контрольной групп вводили в ингаляционный наркоз и проводили сбор образцов крови из сердечной полости для определения титра антител в сыворотке крови. После сбора всех индивидуальных образцов крови в вакуумные пробирки их оставляли при комнатной температуре на 20 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 1500 g без охлаждения. Надосадочную жидкость переносили в 1.5-мл стерильные пробирки и замораживали при –80°C.

Для определения титра антител к специфическим компонентам вакцины (антигены E6 и E7 ВПЧ16) в сыворотке крови мышей использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (**ИФА**). Для этого белки E6-CBD и E7-CBD, разведенные в 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере до концентрации 1 мкг/мл, сорбировали в 96-луночном планшете (Costar® Assay Plate, "Corning Incorporated", США) в количестве 100 нг белка на лунку в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее проводили блокировку с использованием Blocker™ Casein in PBS ("Thermo Scien-

Таблица 1. Состав одной дозы (объемом 150 мкл) испытуемых иммуногенных композиций

Название композиции	Описание	Основные компоненты
CBD1	Иммуногенная композиция с двумя рекомбинантными антигенами E6-CBD и E7-CBD	E6-CBD – 33.1 мкг E7-CBD – 41.2 мкг ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг CpG ODN – 30 мкг
CBD2	Иммуногенная композиция с одним рекомбинантным антигеном E6-CBD	E6-CBD – 33.1 мкг ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг CpG ODN – 30 мкг
CBD3	Иммуногенная композиция с одним рекомбинантным антигеном E7-CBD	E7-CBD – 41.2 мкг ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг CpG ODN – 30 мкг

tific", США) в течение 1 ч при температуре 37°C. Затем добавляли 100 мкл сыворотки, разведенной в соотношении 1 : 100–1 : 1024000 в промывочном буфере PBST (фосфатно-солевой буфер, "ПанЭко", Россия) с 0.05% твин-20, инкубировали 1 ч при 37°C. Для обнаружения антител, связавшихся с сорбированными антигенами, добавляли вторичные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена ("ИМТЕК", Россия), разведенные в PBST в соотношении 1 : 10000, инкубировали 1 ч при 37°C. Затем добавляли 100 мкл ТМБ-субстрата для пероксидазы хрена ("ИМТЕК", Россия), инкубировали плашки при комнатной температуре 5–7 мин, затем останавливали реакцию добавлением 50 мкл 2 М серной кислоты. С помощью микропланшетного ридера Spectramax M5e ("Molecular Devices", США) измеряли поглощение при длине волны 450 нм. Количественно титр определяли как предельное разведение сыворотки, при котором еще наблюдается регистрируемый данным методом положительный эффект взаимодействия антисыворотки с антигеном.

Экспериментальная модель мышей для оценки противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций. Для создания экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ16-ассоциированными злокачественными новообразованиями использовали модифицированную клеточную линию рака молочной железы мыши 4T1 (ATCC CRL-2539™) со стабильной экспрессией полноразмерных онкогенных белков E6 и E7 ВПЧ16 (далее – клетки 4T1 E6/E7), которую получали путем трансфекции вектором, содержащим полноразмерные рамки считывания онкогенов E6 и E7 ВПЧ 16 типа под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV-Neo-Bam).

Мышам линии BALB/c (n = 40) в правый бок подкожно одноразовыми инсулиновыми шприцами вводили суспензию 0.25×10^6 туморогенных клеток 4T1 E6/E7 в физиологическом растворе объемом 100 мкл. Начиная с 3 сут после инъекции, пальпацией ежедневно проверяли наличие сформированного опухолевого узелка. Измерения линейных параметров аутографтов, то есть "длины" и "ширины", проводили с помощью электронного штангенциркуля через равные временные промежутки. Для удобства визуальной детекции, потенциального повышения точности измерений и дальнейшего извлечения аутографта аккуратно, не допуская повреждений кожного покрова, выбривали шерстяной покров в области сформированного аутографта электрической машинкой для стрижки волос.

Мониторинг физиологического состояния мышей проводили ежедневно в течение всего эксперимента. Особое внимание уделяли животным, имеющим нездоровый внешний вид (истощение, быстрая потеря более 30% массы тела, кахексия), поведенческим (потеря аппетита, физической активности) и физиологическим (нарушения дефекации и мочеиспускания, изменения слизистых оболочек и кожных покровов) аспектам их жизнедеятельности.

Исследование противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций. После формирования опухолевых узелков на 5-е сут после введения клеток 4T1 E6/E7 мышам трех опытных групп (n = 10, группы CBD1–CBD3, табл. 1) была сделана первая инъекция иммуногенных композиций и далее – еще две инъекции соответствующих иммуногенных композиций с интервалом в 5 сут (трехэтапная иммунизация). Инъекцию проводили одноразовым стерильным инсулиновым шприцом подкожно в холку животного. Объем раствора для введения составлял 150 мкл. Животным контрольной группы (n = 10) по описанной схеме вводили физиологический раствор.

Для оценки противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций проводили визуальный осмотр аутографтов, анализировали кривые роста, терминальный объем и вес аутографтов. Ви-

зуальный осмотр аутографтов осуществляли при каждом измерении их параметров на предмет наличия очагов некроза.

Анализ кривых роста аутографтов. По полученным в ходе эксперимента измерениям линейных параметров (“ширина” и “длина”) рассчитывали объем каждого аутографта по следующей формуле:

$$V_1 = \frac{a^2 b}{2}, \quad (1)$$

где a – “ширина”, b – “длина”, $a \leq b$. Далее строили график зависимости объема аутографтов от количества дней после инъекции клеток 4T1 E6/E7 с учетом стандартных отклонений.

Анализ терминального объема и веса аутографтов. По окончании исследования мышей терминировали парами эфира. После извлечения аутографтов измеряли их третий линейный параметр – “высоту” (c). Для расчета терминального объема аутографтов использовали аппроксимированную формулу объема эллипсоида, поскольку данная пространственная фигура наиболее близка к форме подкожных аутографтов:

$$V_{элл} = \frac{4}{3}\pi abc,$$

где a, b, c – полуоси эллипсоида.

Аппроксимация:

$$V_2 = \frac{abc}{2}, \quad (2)$$

где a, b, c – “ширина”, “длина” и “высота” соответственно.

Аутографты взвешивали на электронных весах и строили гистограмму среднего веса терминальных аутографтов с учетом стандартных отклонений.

Противоопухолевый эффект иммуногенной композиции считали потенциально положительным при отсутствии пересечения пределов погрешностей кривых/столбцов, соответствующих опытным и контрольной группам. Анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение генно-инженерных конструкций и штаммов-продуцентов рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD. На первом этапе работы были спланированы последовательности синтетических генов, кодирующих онкогенные белки E6 и E7 ВПЧ16. Нуклеотидные последовательности были оптимизированы за счет вырожденных позиций нуклеотидных остатков таким образом, чтобы в них по возможности присутствовали кодоны, наиболее часто встречающиеся в *E. coli*. Также была проведена корректировка вторичной структуры транскрибируемой мРНК с целью предупреждения образования шпилек и сложных элементов вторичной структуры, которые могут снижать эффективность трансляции. Последовательности генов фланкировали сайтами эндонуклеаз NcoI и Kpn2I на 5'- и 3'-концах соответственно для последующего клонирования с использованием плазмиды pR1504 на основе вектора pQE-6 в *E. coli* M15. Далее клонированные гены, кодирующие белки E6 и E7, встраивали по сайтам рестрикции BamHI, BglI и BglII в экспрессионные векторы на основе плазмиды pQE-6, содержащие последовательность гена CBD из термофильного микроорганизма *Anaerocellum thermophilum*, соединенные через глицин-сериновый спейсер. Полученными векторами трансформировали штаммы *E. coli* BL21 [pRep4] и M15 [pRep4].

Индукция экспрессии обоих рекомбинантных белков с помощью ИПТГ приводила к накоплению соответствующих продуктов ожидаемой молекулярной массы. Содержание белков E6-CBD и E7-CBD составляло 15%.

Выделение и очистка рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD. Процедура выделения и очистки полученных в данной работе рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD основана на способности специфически связываться с целлюлозосодержащим сорбентом Perloza MT500 за счет целлюлозосвязывающего домена, что позволяет проводить процедуру связывания и очистки рекомбинантных белков на твердой фазе в одну стадию. Важной особенностью является отсутствие у штаммов *E. coli* BL21 и M15 собственных белков, специфически взаимодействующих с целлюлозой.

Разработанная методика выделения и очистки рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD из индуцированных клеток штаммов-продуцентов включает следующие стадии: осаждение клеток из культуральной среды центрифугированием, лизис и разрушение клеток посредством обработки лизоцимом и ультразвуком, разделение методом центрифугирования белков легкорастворимой фракции и нерастворимых белков, очистка рекомбинантных белков с помощью аффинной хроматографии на целлюлозосодержащем сорбенте, стерилизующая фильтрация.

Анализ фракций, полученных на первом этапе очистки, показал, что целевые рекомбинантные белки E6-CBD и E7-CBD находятся во фракции легкорастворимых белков и частично – во фракции нерастворимых белков (рис. 1 и 2, дорожки *1* и *2*). Для дальнейшей очистки рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD использовали супернатант (рис. 1 и 2, дорожки *1*).

Результаты электрофоретического разделения в ПААГ по Лэммли разных фракций рекомби-

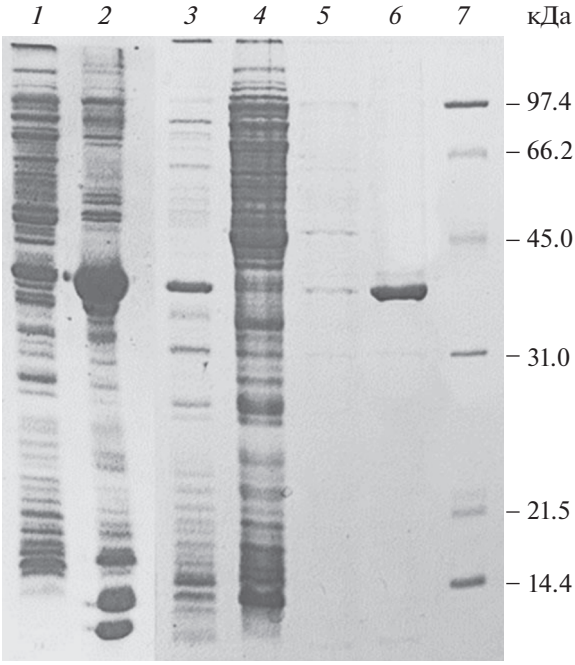


Рис. 1. Электрофореграмма разделения в 12%-ном ПААГ белковых фракций, полученных при очистке рекомбинантного белка Е6-CBD: *1* – супернатант после лизиса биомассы штамма-продуцента Е6-CBD; *2* – осадок после лизиса биомассы клеток штамма-продуцента Е6-CBD; *3* – белки супернатанта после лизиса биомассы, не связавшиеся с Perloza MT500; *4* – промывка 20 мМ Трис-HCl-буфером (pH 8.0) с 0.1% Тритона X100; *5* – промывка Трис-HCl-буфером (pH 8.0) без Тритона X100; *6* – рекомбинантный белок Е6-CBD (41.2 кДа), элюированный с сорбента 6 М мочевиной; *7* – белковые маркеры молекулярной массы.

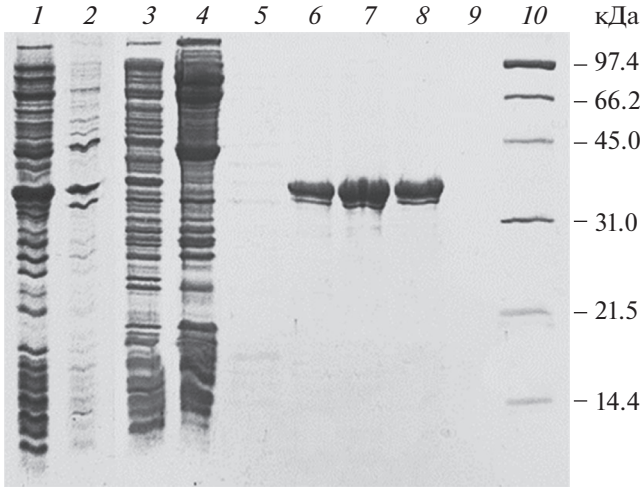


Рис. 2. Электрофореграмма разделения в 12%-ном ПААГ белковых фракций, полученных в процессе выделения и очистки рекомбинантного белка Е7-CBD: *1* – супернатант после лизиса биомассы штамма-продуцента Е7-CBD; *2* – осадок после лизиса биомассы клеток штамма-продуцента Е7-CBD; *3* – белки супернатанта после лизиса биомассы, не связавшиеся с Perloza MT500; *4* – промывка 20 мМ Трис-HCl-буфером (pH 8.0) с 0.1% Тритона X100; *5* – промывка Трис-HCl-буфером (pH 8.0) без Тритона X100; *6–8* – рекомбинантный белок Е7-CBD (33.1 кДа), элюированный с сорбента 6 М мочевиной; *10* – белковые маркеры молекулярной массы.

нантных белков Е6-CBD (41.2 кДа) и Е7-CBD (33.1 кДа), полученных в процессе выделения и очистки, приведены на рис. 1 и 2. Очищенные белки представляли собой гомогенные препараты, молекулярные массы полученных белков соответствовали ожидаемым.

Выход рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD после очистки по разработанной методике из 1 г биомассы клеток-продуцентов составил 4.5 мг для каждого из белков, степень очистки полученных рекомбинантных белков – не менее 95%. При изучении стабильности рекомбинантных белков было показано, что образцы обоих белков при хранении в течение трех месяцев при +4°C полностью сохраняли гомогенность и соответствие молекулярным массам, признаки деградации белков или протеолитического гидролиза отсутствовали (данные не приведены).

Таким образом, в результате разработанных схем клонирования, экспрессии, одностадийной очистки и рефолдинга были получены препараты рекомбинантных белков Е6-CBD и Е7-CBD. В основе использованного подхода лежит технология получения слитных белков с целлюлозосвязывающими доменами, успешно примененная ранее для клонирования, экспрессии и очистки различных белков [22–24]. Целлюлозосвязывающие домены позволяют проводить очистку белков на недорогих целлюлозосодержащих носителях, обеспечивают стабильность целевых белков, а также в ряде случаев позволяют повысить растворимость химерного белка по сравнению с исходным вариантом. В случае онкобелка Е7 ВПЧ16 был получен полностью растворимый белок Е7-CBD. Это не удивительно, учитывая накопленный ранее опыт других исследователей, получивших экспрессию растворимого белка Е7 при различных вариантах клонирования в клетках *E. coli* [16, 25, 26]. В случае онкобелка Е6 ВПЧ16 за счет присоединения CBD удалось получить химерный белок Е6-CBD частично в растворимой форме. Близкий результат описан в работе [20], в которой был получен химерный белок Е6, соединенный с глутатион-*S*-трансферазой, однако в физиологических условиях этот белок оказался нестабильным – выделить его удалось лишь в сильнощелочных условиях, что, безусловно, затруднит использование данного белка. Полученный рекомбинантный белок Е6-CBD, выделенный на целлюлозосодержащем сорбенте, характеризовался стабильностью при хранении при значениях pH, близких к нейтральным.

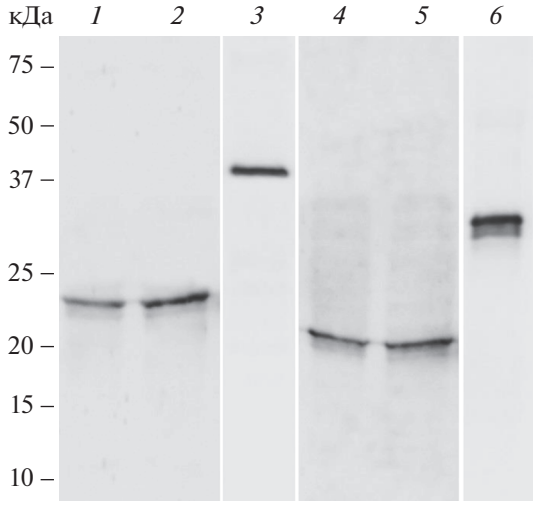


Рис. 3. Результаты вестерн-блоттинга, полученные с использованием коммерческих антител к антигенам E6 (*1–3*) и E7 ВПЧ16 (*4–6*), ВПЧ16-положительных клеточных линий карцином шейки матки SiHa (*1*, *4*) и Ca Ski (*2*, *5*), а также препаратов рекомбинантных белков E6-CBD (*3*) и E7-CBD (*6*).

Вестерн-блоттинг. С целью проверки сохранности иммунореактивных эпитопов у полученных рекомбинантных антигенов E6-CBD и E7-CBD после процедур выделения и очистки был проведен вестерн-блоттинг с использованием специфических коммерческих антител к белкам E6 и E7 ВПЧ16 и ВПЧ16-положительных клеточных линий карцином шейки матки SiHa и Ca Ski (ATCC, США).

Результаты вестерн-блоттинга представлены на рис. 3. Были выявлены полосы размером ~41.2 и ~33.1 кДа, что соответствовало теоретическим молекулярным массам рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD.

Таким образом, методом вестерн-блоттинга было подтверждено наличие антигенных свойств у обоих рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD.

Создание иммуногенных композиций на основе рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD. На основе полученных рекомбинантных антигенов E6-CBD и E7-CBD были разработаны три варианта иммуногенных композиций (табл. 1), в состав которых входят оба рекомбинантных антигена либо один антиген, а также дополнительный иммуномодулирующий компонент – иммобилизованные на ДЭАЭ-декстране CpG-олигонуклеотиды, используемые в качестве адъюванта для индукции цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа на опухолевые антигены.

Разработана схема трехэтапной иммунизации с подкожным введением иммуногенных композиций в объеме 150 мкл в холку животного с интервалом в 5 сут.

Оценка иммуногенности *in vivo* на мышах линии BALB/c. Опытным группам мышей линии BALB/c (n = 10) производили инъекции иммуногенной композиции CBD1 (табл. 1), содержащей рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD, трехкратно с интервалом в 5 сут. Животным контрольной группы (n = 10) по описанной схеме вводили физиологический раствор. Для потенциальной активации гуморального иммунного ответа мышей содержали в течение 14 и 42 сут после последней инъекции иммуногенной композиции CBD1. Затем животных терминировали, проводили забор крови и определяли титр антител в сыворотке крови методом непрямого ИФА.

Результаты исследования представлены на рис. 4. Титр специфичных к E6-CBD и E7-CBD антител достигал значений ~1 : 128 000, который сохранялся на высоком уровне в течение 14 и 42 сут после последней инъекции иммуногенной композиции CBD1 (рис. 4а, 4б).

Таким образом, исследование гуморального иммунного ответа на трехкратное введение иммуногенной композиции CBD1 показало, что специфические компоненты иммуногенных композиций – рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD ВПЧ16 – являются высокоиммуногенными и вызывают повышение гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c *in vivo*. Высокий титр специфических антител к рекомбинантным антигенам E6-CBD и E7-CBD сохранялся как минимум в течение 42 сут.

Исследование противоопухолевого эффекта на модели мышей линии BALB/c с ВПЧ-16-ассоциированными опухолями. Противоопухолевый эффект трех вариантов иммуногенных композиций на основе рекомбинантных антигенов E6-CBD и E7-CBD (табл. 1) изучали *in vivo* с использованием созданной в данной работе экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ-ассоциированными опухолями, развитие которых было индуцировано подкожным введением модифицированных клеток рака молочной железы мыши 4T1 (ATCC CRL-2539™) со стабильной экспрессией полноразмерных онкобелков E6 и E7 ВПЧ16.

После формирования аутографтов (опухолевых узелков) (на 5-е сут после введения клеток 4T1 E6/E7) мышам опытных групп (n = 10; группы CBD1–CBD3, табл. 1) была сделана первая инъекция иммуногенной композиции подкожно в холку и далее – еще две инъекции с интервалом в 5 сут (трехэтапная иммунизация). Животным контрольной группы (n = 10) по описанной схеме вводили физиологический раствор.

После каждой инъекции иммуногенных композиций у животных опытных групп наблюда-

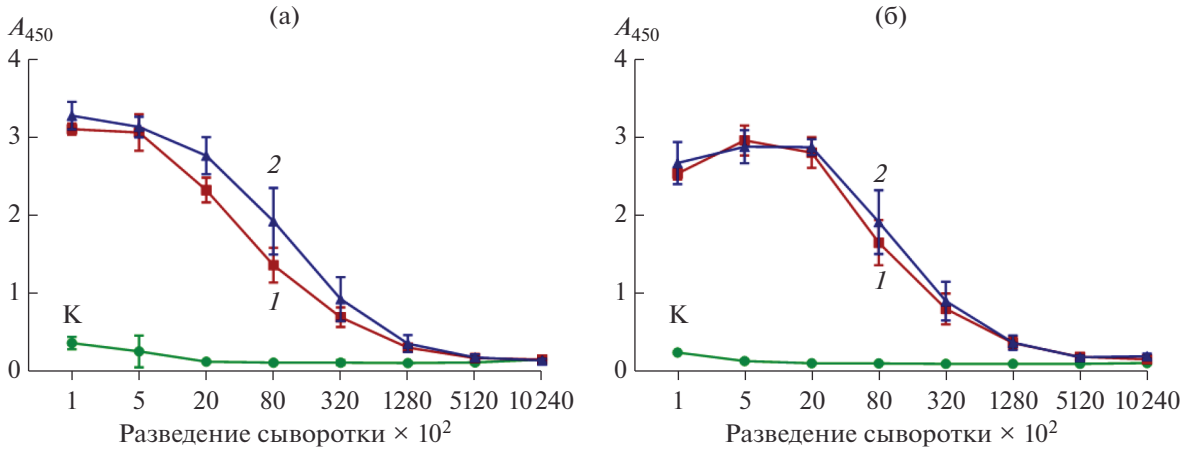


Рис. 4. Титр антител к рекомбинантным антигенам Е6-CBD (а) и Е7-CBD (б), наблюдаемый через 14 (*1*) и 42 (*2*) сут после трехкратного введения иммуногенной композиции CBD1 мышам линии BALB/c (состав CBD1 см. в табл. 1). К – контроль.

лось снижение активности и аппетита, длящееся не более суток, без нарушения прочих физиологических функций. По окончании иммунизации такие состояния больше не отмечались. На 21–24-е сут после инъекции туморогенных клеток 4T1 E6/E7 мыши контрольной группы имели нездоровый внешний вид, начали проявляться признаки истощения и потери массы тела, снижение активности, потускнение и пожелтение волосяных покровов, незначительное увеличение регионарных (относительно произведенной инъекции клеток) лимфоузлов. На 27-е сут после инъекции клеток 4T1 E6/E7 в контрольной группе мышей были зафиксированы три случая летального исхода, наиболее вероятной причиной которых послужило активное разрастание аутографтов с инвазией в брюшную полость и последующим поражением внутренних органов.

На 18-е сут после инъекции клеток 4T1 E6/E7 была детектирована статистически значимая разница между аутографтами контрольной и опытных групп. На основании дальнейших произведенных измерений линейных параметров аутографтов (“ширина” и “длина”) был рассчитан объем аутографтов по формуле (1) и построен график зависимости объема аутографтов от количества суток после инъекции клеток 4T1 E6/E7 (рис. 5а). На 30-е сут после инъекции клеток 4T1 E6/E7 объем аутографтов опытных групп был в среднем в 5 раз меньше, чем объем аутографтов контрольной группы, причем наименьшим объемом среди опытных групп характеризовались аутографты группы CBD1 – до 11 раз меньше, а наибольшими – аутографты группы CBD3 – до 5.2 раз меньше по сравнению с животными контрольной группы.

По окончании исследований (на 30-е сут после инъекции клеток 4T1 E6/E7) сформированные аутографты извлекали и измеряли третий линейный параметр (“высоту”), с использованием которого был рассчитан их терминальный объем по аппроксимированной формуле объема эллипсоида (2). Благодаря использованию данной формулы было выявлено, что объем аутографтов мышей опытных групп меньше аутографтов мышей контрольной группы в среднем в 8.5 раз; аутографтов группы CBD1– до 18.2 раз, а CBD3– до 8.8 раз (рис. 5б).

По результатам взвешивания терминальных аутографтов было установлено, что аутографты опытных групп легче аутографтов контрольной группы в среднем в 5.7 раз; аутографты группы CBD1 – до 11.5 раз, а CBD3 – до 6 раз (рис. 5в).

Для комплексной оценки противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций также следует учитывать внешний вид аутографтов как в процессе мониторинга *in vivo*, так и после их извлечения по окончании эксперимента. На 18-е сут после инъекции клеток 4T1 E6/E7 по результатам визуального осмотра было детектировано наличие очагов некроза в зоне формирования аутографтов у животных опытных групп в 30–40% случаев, в то время как у аутографтов контрольной группы очаги некроза полностью отсутствовали. На момент завершения эксперимента у аутографтов опытных групп явно детектировался центральный некроз в 60–90% случаев. У аутографтов контрольной группы очаги некроза появились только к 27-м сут после инъекции клеток 4T1 E6/E7, число случаев появления которых возросло до 40% к моменту терминирования (рис. 5г, 5д).

На основании данных, полученных в ходе мониторинга животных, и анализа кривых роста, терминального объема и веса аутографтов можно сделать вывод о наличии потенциального проти-

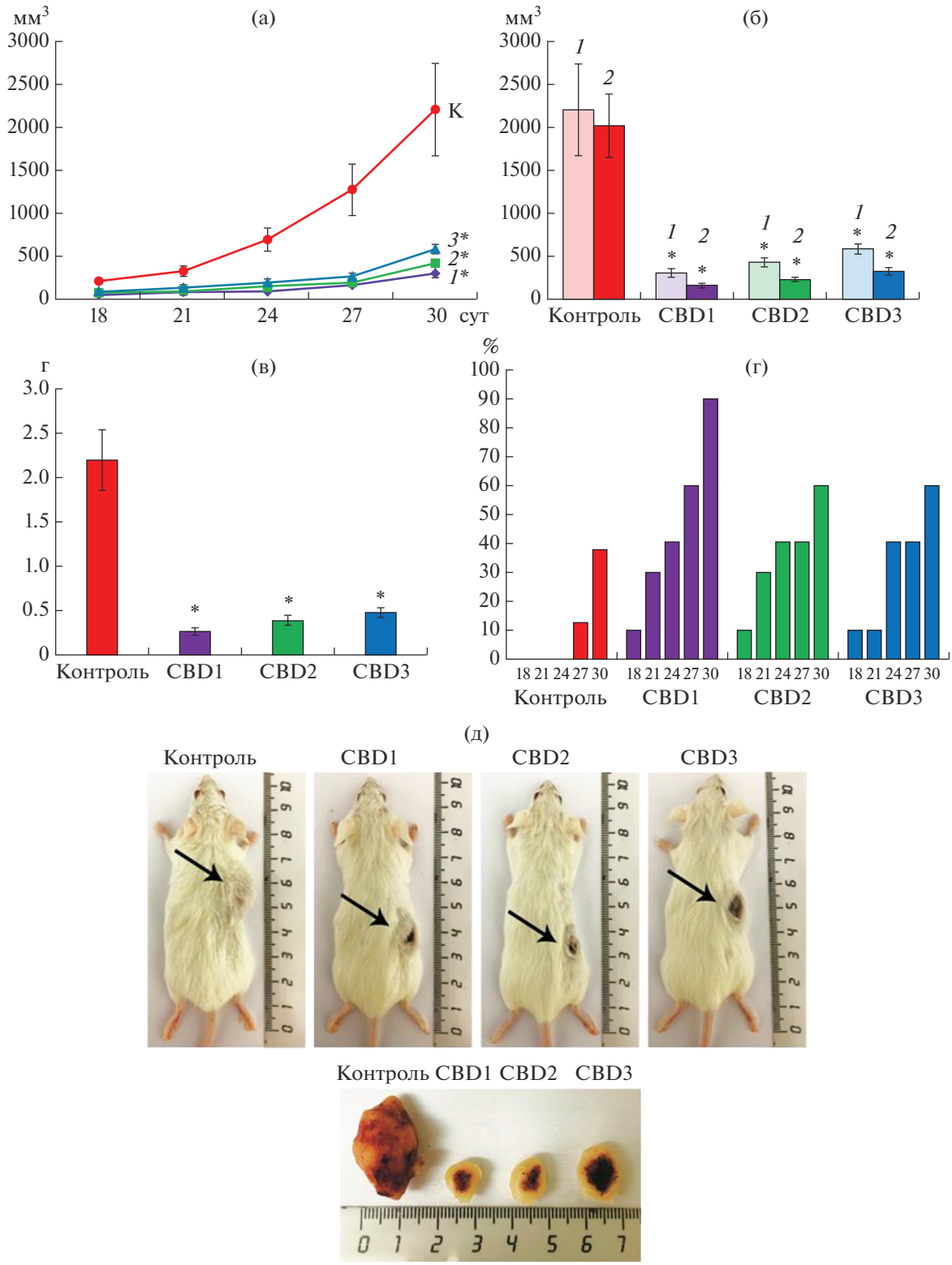


Рис. 5. Оценка эффективности иммуногенных композиций CBD1–CBD3 *in vivo* на экспериментальной модели мышей линии BALB/c с ВПЧ16-ассоциированными опухолями: а – динамика роста аутографтов после трехкратного введения иммуногенных композиций (указаны сутки после инъекции туморогенных клеток 4T1 E6/E7); K – контроль, *1* – CBD-1, *2* – CBD-2, *3* – CBD-3; б – объем терминальных аутографтов: *1* – объем, рассчитанный с использованием двух линейных параметров по формуле (1); *2* – объем, рассчитанный с использованием трех линейных параметров по формуле (2); в – вес терминальных аутографтов; г – динамика появления очагов некроза у аутографтов мышей контрольной и опытных групп (цифры под столбцами – сутки после инъекции туморогенных клеток 4T1 E6/E7); д – внешний вид типичных для каждой группы терминированных животных со сформированными аутографтами (указаны стрелками) и извлеченных аутографтов. $*p < 0.05$ (статистически значимая разница между контрольной и опытными группами по *t*-критерию Стьюдента).

воопухолевого эффекта у исследуемых иммуногенных композиций CBD1–CBD3. Иммуногенные композиции CBD2 и CBD3, содержащие рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD по отдельности, обладали противоопухолевым эффектом. Однако противоопухолевый эффект композиции CBD1 был выше, следовательно, для достижения наибольшей противоопухолевой активности в состав иммуногенной композиции должны входить оба рекомбинантных антигена E6-CBD и E7-CBD (композиция CBD1).

Таким образом, в результате проведенных исследований синтезом в *E. coli* впервые были получены препараты рекомбинантных белков, представляющих собой антигены Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа, соединенные с помощью глицин-серинового спейсера с целлюлозосвязывающим доменом из *Anaerocellum thermophilum*. Использование данного домена в составе слитных рекомбинантных белков позволило разработать простую и эффективную одностадийную технологию выделения и очистки белковых препаратов.

Наличие антигенных свойств у полученных рекомбинантных белков E6-CBD и E7-CBD подтверждено методом вестерн-блоттинга с использованием коммерческих антител к антигенам Е6 и Е7 ВПЧ16.

Анализ активации гуморального ответа и противоопухолевого эффекта иммуногенных композиций на основе рекомбинантных антигенов E6-CBD и E7-CBD ВПЧ16 в условиях 3-этапной иммунизации мышей линии BALB/c показал, что специфические компоненты иммуногенных композиций – рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD – являются высокоиммуногенными и обладают противоопухолевым эффектом *in vivo*.

Приведенные характеристики позволяют считать полученные в работе новые рекомбинантные антигены E6-CBD и E7-CBD перспективными для изучения возможности их медицинского применения в двух направлениях: 1) в клинической практике – в качестве основных специфических компонентов разрабатываемых терапевтических вакцин для лечения ВПЧ16-ассоциированных неопластических поражений различных локализаций (рак шейки матки, карциномы аногенитального тракта, ротоглотки); 2) в диагностике – при разработке диагностических наборов для выявления антител к белкам Е6 и Е7 у пациентов с ВПЧ16-ассоциированными злокачественными новообразованиями.

Работа выполнена в рамках государственного задания федерального государственного бюджетного учреждения “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического агенства № 388-00102-20-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на лабораторных мышах линии BALB/c проводили в строгом соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вонский М.С., Рунов А.Л., Гордейчук И.В., Исагулянц М.Г.* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 7. С. 1016–1035. https://doi.org/10.1134/S0320972519070108
2. *Вонский М.С., Шабаева М.Г., Рунов А.Л., Лебедева Н.Н., Човдхари С., Палефский Д.М., Исагулянц М.Г.* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 7. С. 995–1015. https://doi.org/10.1134/S0320972519070091
3. *Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A.* // CA Cancer J. Clin. 2018. V. 68. P. 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492
4. *Bruni L., Albero G., Serrano B., Mena M., Gómez D., Muñoz J., Bosch F.X., de Sanjosé S.* // Human Papillomavirus and Related Diseases Report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), 2019. 315 p., https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf
5. *Liu Z., Tasnuva R., Nyitray A.* // Sex. Health. 2016. V. 13. P. 10–21. https://doi.org/10.1071/SH15089
6. *Зароченцева Н.В., Белая Ю.М., Самсыгина Г.А., Щербакова М.Ю., Выжлова Е.Н., Малиновская В.В.*// Лечащий врач. 2017. Т. 4. С. 56–63.
7. *Hancock G., Hellner K., Dorrell L.* // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2018. V. 47. P. 59–72. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.09.008
8. *Klingelhutz A.J., Roman A.* // Virology. 2012. V. 424. № 2. P. 77–98. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.018
9. *Arbyn M., Xu L., Simoens C., Martin-Hirsch P.P.L.* // Cochrane Database Syst. Rev. 2018. V. 5. CD009069. https://doi.org/10.1002/14651858.CD009069.pub3
10. *Cheng M.A., Farmer E., Huang C., Lin J., Hung C.F., Wu T.C.* // Hum. Gene Ther. 2018. V. 29. P. 971–996. https://doi.org/10.1089/hum.2017.197
11. *Yang A., Farmer E., Lin J., Wu T.C., Hung C.F.* // Virus Res. 2017. V. 231. P. 148–165. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.002
12. *Nakagawa M., Stites D.P., Patel S., Farhat S., Scott M., Hills N.K., Palefsky J.M., Moscicki A.B.* // J. Infect. Dis. 2000. V. 182. P. 595–598. https://doi.org/10.1086/315706
13. *Combes J.D., Pawlita M., Waterboer T., Hammouda D., Rajkumar T., Vanhems P., Snijders P., Herrero R., Franceschi S., Clifford G.* // Int. J. Cancer. 2014. V. 135. P. 2453–2461. https://doi.org/10.1002/ijc.28888

14. *McIntyre M.C., Frattini M.G., Grossmon S., Laimons L.A.* // J. Virol. 1993. V. 67. № 6. P. 3142–3150. https://doi.org/10.1128/JVI.67.6.3142-3150.1993

15. *Pahel G., Aulabaugh A., Short S.A., Barnes J.A., Painter G.R., Ray P., Phelps W.C.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 68. № 34. P. 26018–26025.

16. *Patrick D.R., Zhang K., Defeo-Jones D., Vuocolo G.R., Maigetter R.Z., Sardana M.K., Oliff A., Heimbrook D.C.* // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 10. P. 6910–6915.

17. *Imai Y., Tsunokawa Y., Sugimura T., Terada M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 164. № 3. P. 1402–1410. https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)91826-3

18. *Verma R.R., Sriraman R., Rana S.K., Ponnanna N.M., Rajendar B., Ghantasala P., Rajendra L., Matur R.V., Srinivasan V.A.* // Protein Expr. Purif. 2013. V. 92. № 1. P. 41–47. https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.010

19. *Nomine Y., Ristriani T., Laurent C., Lefevre J.F., Weiss E., Trave G.* // Protein Expr. Purif. 2001. V. 23. № 1. P. 22–32. https://doi.org/10.1006/prep.2001.1451

20. *Xu M.L., Kim S.C., Kim H.J., Ju W., Kim Y.H., Kim H.J.* // Protein Expr. Purif. 2017. V. 132. P. 19–26. https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.004

21. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 654 p.

22. *Лящук А.М., Лунин В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Родионова И.В., Кормилицына М.И. и др.* // ЖМЭИ. 2006. Т. 4. С. 65–68.

23. *Сергиенко О.В., Лящук А.М., Аксенова Е.И., Галушкина З.М., Полетаева Н.Н., Шарапова Н.Е. и др.* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 1. С. 16–20.

24. *Velikodvorskaya G.A., Tikhonova T.V., Gurvits I.D., Karyagina A.S., Lavrova N.V., Sergienko O.V. et al.* // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 8071–8075. https://doi.org/10.1128/AEM.01517-10

25. *Fernando G.J., Murray B., Zhou J., Frazer I.H.* // Clin. Exp. Immunol. 1999. V. 115. P. 397–403. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00813.x

26. *Petrone L., Ammendolia M.G., Cesolini A., Caimi S., Superti F., Giorgi C., Di Bonito P.* // J. Transl. Med. 2011. V. 9. № 69. https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-69

Recombinant Antigens E6 and E7 of Human Papillomavirus Type 16: Preparation, Purification, Evaluation of Immunogenicity and Antitumor Effect *in vivo*

M. E. Subbotina[a, b, *], T. M. Grunina[a, b], O. V. Sergienko[b], N. V. Elkina[c], D. S. Elkin[c], M. V. Novikova[c], P. B. Kopnin[c], and S. V. Vinokurova[c]

[a]*Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121 Russia*

[b]*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia*

[c]*Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia*

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

Recombinant proteins CBD-E6 and CBD-E7, which are antigens E6 and E7 of the human papillomavirus of high carcinogenic 16 (HPV16), connected with a glycine serine spacer with a cellulose-binding domain (CBD) from *Anaerocellum thermophilum*, were obtained by synthesis in a heterologous expression system in *Escherichia coli*. A simple and effective one-step technology for isolation and purification of recombinant proteins E6-CBD and E7-CBD was developed. The presence of antigenic properties in the obtained protein preparations was confirmed by Western blotting. Three variants of immunogenic compositions with the recombinant proteins E6-CBD, E7-CBD and a 3-stage immunization scheme were developed, immunogenicity was assessed in BALB/c mice, the antitumor effect of the immunogenic compositions was studied using the experimental model of BALB/c mice with HPV16-associated tumors. E6-CBD and E7-CBD have been shown to be highly immunogenic and have an antitumor effect *in vivo*. To achieve the greatest efficiency in the composition of the immunogenic composition, the presence of both E6-CBD and E7-CBD proteins is required. The obtained recombinant proteins E6-CBD and E7-CBD HPV16 can be used in two directions: 1) in clinical practice – as the main specific components of therapeutic vaccines for the treatment of HPV16-associated neoplastic lesions of various localizations (cervical cancer, carcinoma of the anogenital tract, oropharynx); 2) in diagnostics – in development of diagnostic kits for detecting antibodies to E6 and E7 oncoproteins in patients with HPV16-associated malignant neoplasms.

Keywords: human papillomavirus, oncogenic proteins E6 and E7, cervical cancer, therapeutic vaccines, immunogenicity, antitumor effect

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 303–310

УДК 57:088.1

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОЦИСТИНА-LR В МОРЕПРОДУКТАХ

© 2021 г. Е. А. Зверева[1], О. Д. Гендриксон[1], А. В. Жердев[1, *], Б. Б. Дзантиев[1]

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

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

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.
После доработки 01.12.2020 г.
Принята к публикации 22.12.2020 г.

Для экспрессного контроля высокотоксичного фикотоксина микроцистина-LR в морепродуктах разработаны и сопоставлены иммунохроматографические тест-системы с использованием в качестве маркеров двух видов наночастиц золота – сферических частиц и частиц с развитой поверхностью ("наноцветов"). Функционирование тест-систем основано на непрямом конкурентном анализе, в котором детектируемые иммунные комплексы включают нативные специфичные к микроцистину-LR антитела и меченные наночастицами антивидовые антитела. Разработанные тест-системы позволяют детектировать микроцистин-LR в течение 18 мин с инструментальными пределами обнаружения, равными 0.2 и 0.1 нг/мл при использовании сферических наночастиц и наноцветов золота соответственно. Визуальный предел обнаружения составил 1 нг/мл для обеих схем. Охарактеризованы параметры наночастиц, обусловливающие аналитические характеристики тест-систем с их использованием. Показана пригодность разработанных тест-систем для контроля контаминации проб рыбы и морепродуктов (креветки, осьминоги, кальмары, мидии), сочетающего экспрессные стадии пробоподготовки и иммунохроматографии.

Ключевые слова: фикотоксины, микроцистин-LR, иммунохроматографический анализ, безопасность пищевой продукции

DOI: 10.31857/S055510992103017X

Развитие мирового рынка продовольствия обусловило значимость оперативного мониторинга контаминации продуктов питания на разных этапах производства и потребления [1]. В данной ситуации возрастает потребность в достоверном, производительном и чувствительном контроле токсичных контаминант, которые могут присутствовать в используемом сырье и готовой пищевой продукции. Принципиальное значение имеет возможность быстрого, в течение 5–15 мин, получения информации о наличии и уровне контролируемых соединений, что позволяет оперативно предпринять действия по защите от воздействия токсичных контаминант.

Высокотоксичный фикотоксин микроцистин-LR (**MC-LR**) продуцируется цианобактериями, главным образом, *Microcystis aeruginosa*, которые входят в состав планктона и бентоса и служат пищей для многих водных организмов, в том числе для моллюсков и рыбы, накапливаясь в их организмах [2]. Из различных микроцистинов MC-LR является наиболее распространенной и изученной формой [3]. Перенос MC-LR вдоль пищевых цепочек приводит к серьезной опасности для человека. Попадание в организм человека происходит при употреблении контаминированной воды и морепродуктов [4, 5]. Острое токсическое действие выражается в абдоминальном болевом синдроме, тошноте, рвоте, диарее, головных болях, сухом кашле, пневмонии. Хроническое воздействие MC-LR обусловлено его высокой гепатотоксичностью, генотоксичностью и канцерогенностью [6]. По строению MC-LR представляет собой циклический гептапептид, стабильный в широком диапазоне pH и температур. Благодаря циклической структуре разрушение MC-LR в организме затруднено, что способствует его накоплению и развитию тяжелых токсических эффектов [7].

Учитывая высокую степень токсичности фикотоксинов, принципиальное значение имеет расширение панели существующих аналитических методов их обнаружения за счет новых экспрессных методов с минимумом компонентов и простым протоколом, не зависящим от внешних ресурсов и квалификации персонала. К ним от-

носятся, в частности, иммунохроматографические тест-системы [8].

В иммунохроматографическом анализе (**ИХА**) микроцистина используется широкий спектр маркеров – флуоресцентные, хемилюминесцентные метки, ферменты, коллоидное золото [9–14]. Применение флуоресцентных и хемилюминесцентных меток позволяет детектировать микроцистин с пределом обнаружения (**ПО**) в пикограммовом диапазоне, однако требует специального оборудования (детекторы, сканеры) [10, 14].

Использование сферических наночастиц золота (**НЧЗ**), наиболее распространенных меток в ИХА, позволяет получить воспроизводимый аналитический сигнал при окрашивании зон на тест-полосках в красный цвет и проводить визуальную детекцию с высокой чувствительностью. Так, для иммунохроматографических систем детекции MC-LR в пробах воды, основанных на использовании НЧЗ, показана возможность обнаружения MC-LR в концентрациях до 1 нг/мл [15–17]. В работе [18] показано изменение окраски тестовой зоны при тестировании проб речной воды в интервале концентраций MC-LR 0.1–0.3 нг/мл.

Известно, что коллоидное золото, обладая плазмонными свойствами, может образовывать золи разного цвета, который определяется формой и размером его частиц [19]. Использование наноцветов золота (**НЦЗ**) в ИХА обеспечивает синее окрашивание, что увеличивает контрастность и чувствительность анализа, как было показано на примере ИХА Т2-токсина [20]. В предыдущей работе нами были предложены тест-системы для детекции микроцистина-LR в воде и образцах рыбы, основанные на прямом и непрямом форматах ИХА [21]. В качестве меченых иммунореагентов использовались конъюгаты специфических или антивидовых антител с НЧЗ. Непрямое введение метки путем замены конъюгата специфических антител с НЧЗ комбинацией нативных специфических антител и меченых антивидовых антител позволило снизить предел обнаружения MC-LR до 0.2 нг/мл, не усложняя при этом тестирование в целом.

Цель работы – сравнение иммунохроматографических тест-систем, основанных на непрямом введении НЧЗ или НЦЗ в качестве меток, для обнаружения микроцистина-LR и апробация данных тест-систем как средств контроля MC-LR в экстрактах рыбы и морепродуктов.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали MC-LR, этилендиаминтетрауксусную кислоту (**ЭДТА**), бычий сывороточный альбумин (**БСА**), золотохлористоводородную кислоту (**$HAuCl_4$**), сахарозу, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (**ТМБ**), азид натрия, гидрохинон, детергенты тритон X-100 и твин-20 ("Sigma-Aldrich", США), моноклональные антитела к микроцистину-LR и конъюгат MC-LR–БСА ("Eximio Biotec", Китай), антитела козы против иммуноглобулинов мыши (**АК**) и антитела осла против иммуноглобулинов козы (**АО**) ("Arista Biological", США), а также антитела козы против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой хрена (**АК–ПХ**, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия).

Для получения НЧЗ, НЦЗ и их конъюгатов с антителами использовали воду, деионизированную с помощью установки Milli-Q ("Millipore", США). Исходный раствор MC-LR (2 мг/мл) готовили в метаноле ("Fluka", США) и хранили при 4°C.

Иммуноферментный анализ (**ИФА**) проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 ("Corning Costar", США).

ИФА микроцистина. В лунках микропланшета сорбировали по 100 мкл конъюгата MC-LR–БСА в концентрации 0.5 мкг/мл в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержавшем 100 мМ NaCl (**ФБС**), в течение 16 ч при 4°C. После четырехкратной отмывки ФБС, содержавшем 0.05% детергента Тритон X-100 (**ФБСТ**), в лунки вносили по 50 мкл раствора MC-LR (от 10 до 0.005 нг/мл) в ФБСТ, добавляли по 50 мкл специфических антител в концентрации 10 нг/мл и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. После отмывки ФБСТ в лунки микропланшета добавляли по 100 мкл АК–ПХ в разведении 1 : 5000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Микропланшет отмывали 4 раза ФБСТ и 1 раз дистиллированной водой и определяли активность ПХ. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора субстрата (0.42 мМ ТМБ и 1.8 мМ H_2O_2 в 0.1 М цитратном буферном буфере, pH 4.0), инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 1.0 М H_2SO_4 (50 мкл на лунку). Оптическую плотность (**ОП**) продукта реакции измеряли при 450 нм с использованием микропланшетного фотометра Zenyth 3100 ("Anthos Labtec Instruments", Австрия).

Синтез сферических наночастиц золота. Синтез НЧЗ проводили в соответствии с методом [22], для чего к 48.75 мл деионизированной воды добавляли 0.5 мл 1%-ного раствора $HAuCl_4$ и доводили смесь до кипения. После этого для получения НЧЗ диаметром 30 нм в смесь вносили 0.75 мл 1%-ного раствора цитрата натрия, а для получения НЧЗ диаметром 10 нм – 1.5 мл 1%-ного рас-

твора цитрата натрия. Растворы кипятили при перемешивании с использованием обратного холодильника в течение 25 мин. Полученные препараты охлаждали и хранили при 4°С.

Синтез наноцветов золота. НЦЗ получали методом доращивания согласно [20] с модификациями. В качестве центров нуклеации использовали предварительно синтезированные сферические НЧЗ диаметром 10 нм. К 10 мл деионизированной воды последовательно вносили водный раствор $HAuCl_4$ в конечной концентрации 0.12 мМ, раствор НЧЗ в концентрации 0.5% об., 22 мкл 1%-ного водного раствора цитрата натрия и 100 мкл 0.3 М гидрохинона в 0.1 М натрий-цитратном буфере, pH 4.0. Реакцию проводили при комнатной температуре и перемешивании в течение 30 мин.

Получение конъюгатов НЧЗ и НЦЗ с антителами. АК с концентрацией 6 мкг/мл, выбранной согласно [21], диализовали против 10 мМ трис-HCl буфера, pH 8.5, и вносили в раствор НЧЗ или НЦЗ с pH, предварительно доведенным до 8.5 добавлением 0.1 М K_2CO_3. Смеси инкубировали 45 мин при перемешивании и комнатной температуре, вносили раствор 10%-ного БСА в объемном соотношении 40 : 1 и перемешивали еще 15 мин. Полученные конъюгаты осаждали центрифугированием при 8500 g в течение 15 мин при 4°С и ресуспендировали в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 8.5, содержащем 1.0% БСА, 1.0% сахарозы и 0.05% азида натрия (**ТБСА**). Конъюгаты хранили при 4°С.

Определение размеров НЧЗ и НЦЗ. Размерные характеристики препаратов НЧЗ и НЦЗ определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (**ПЭМ**). Растворы НЧЗ и НЦЗ наносили на сеточки (300 меш.), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформаля, растворенного в хлороформе. Микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа JEM-100C ("Jeol", Япония) и анализировали, используя программу Image Tool (Научный центр здоровья при Техасском Университете в Сан-Антонио, США).

Изготовление иммунохроматографических тест-систем. Были использованы наборы мембран, включающие пластиковую подложку с нанесенной на нее нитроцеллюлозной мембраной CNPC (размер пор 15 мкм, "MDI", Индия), разделительную мембрану GFB-R4, адсорбционную мембрану AP045 и мембрану из стекловолокна PT-R7 MdiEasypack ("Advanced Microdevices", Индия).

Для формирования аналитической зоны на рабочую мембрану наносили конъюгат МС-LR–БСА (0.75 мг/мл в ФБС); контрольную зону формировали нанесением АО (0.5 мг/мл в ФБС). Реагенты иммобилизовали с помощью автоматического диспенсера IsoFlow ("Imagene Technology", США) из расчета 0.1 мкл на 1 мм мембраны. На стекловолоконную мембрану вручную наносили конъюгаты АК–НЧЗ и АК–НЦЗ в ТБСА, содержащем 0.05% Твин-20, в разведении, соответствующем $ОП_{520}$ = 2.5. Нагрузка конъюгатов антител с НЧЗ и НЦЗ составляла 32 мкл на 1 см стекловолоконной мембраны.

Мембраны высушивали в течение не менее 20 ч при комнатной температуре и собирали мультимембранный композит, который затем нарезали с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter-1 ("A-Point Technologies", США) на тест-полоски шириной 3.0 мм.

Приготовление проб морепродуктов. Тестируемая пищевая продукция – рыба (треска), мидии, креветки, осьминоги и кальмары – была приобретена в супермаркетах г. Москва (Россия). Пробоподготовка проводилась по методу, предложенному в [21]. Из гомогенизированных проб МС-LR экстрагировали 5%-ным раствором уксусной кислоты, содержащей 0.01 М ЭДТА, в течение 15 мин при перемешивании. Экстракты центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Супернатанты выпаривали, перерастворяли в ФБС и использовали для анализа.

ИХА микроцистина. В лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора МС-LR (от 100 до 0.01 нг/мл в ФБСТ) или экстракты морепродуктов. Добавляли по 50 мкл антител (200 нг/мл в ФБСТ) и инкубировали 3 мин при комнатной температуре, после чего погружали в лунку тест-полоску и через 15 мин контролировали результат анализа.

Детекция результатов ИХА. Тест-полоски сканировали с помощью сканера CanoScan LiDE 90 ("Canon", Япония) и определяли интенсивность окрашивания аналитических зон, используя программу TotalLab ("Nonlinear Dynamics", Великобритания).

Обработка результатов ИФА и ИХА. Зависимость интенсивности аналитического сигнала от концентрации МС-LR аппроксимировали при помощи программного продукта Origin ("Origin Lab", США), используя четырехпараметрическую сигмоидную функцию:

$$Y = (A - B)\big/(1 + (x/C)^D) + B,$$

где x – концентрация МС-LR в пробе, y – интенсивность аналитического сигнала, A и B – асимптотические максимум и минимум (фоновое значение) аналитического сигнала, C – точка перегиба кривой в полулогарифмических координатах (50%-ное ингибирование сигнала) и D – наклон кривой в точке перегиба.

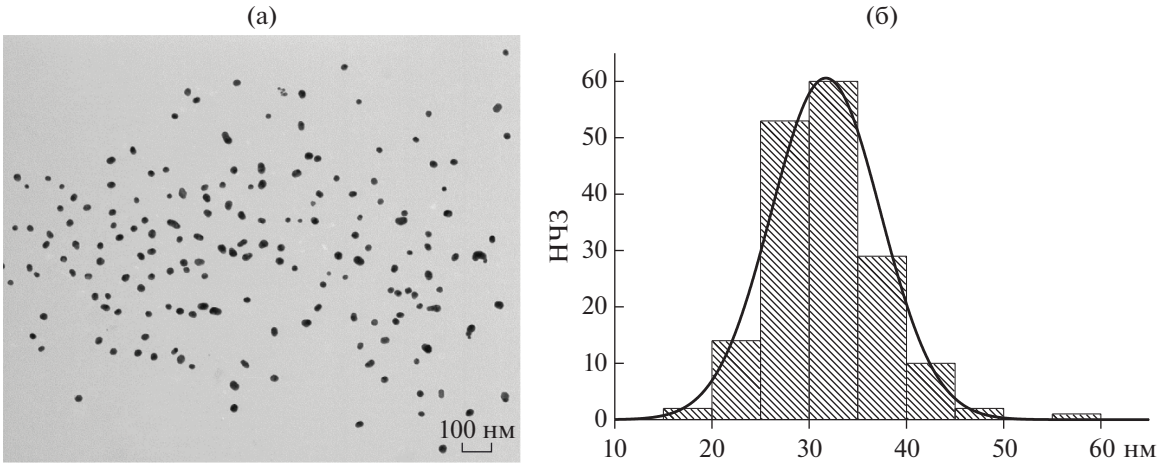


Рис. 1. Микрофотография НЧЗ (а) и гистограмма их распределения по диаметру (б).

Концентрацию MC-LR, вызывающую 10%-ное снижение сигнала, (IC_{10}) рассматривали как количественный (для ИХА – инструментальный) предел обнаружения [23]. Концентрации MC-LR, вызывающие 20- и 80%-ное снижение сигнала, рассматривали в качестве нижнего и верхнего пределов рабочего диапазона определяемых концентраций. Визуальный предел обнаружения соответствовал минимальной концентрации MC-LR, при которой наблюдалось полное отсутствие окрашивания в аналитической зоне.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика иммунореагентов. При разработке иммунохроматографического определения MC-LR применялось коллоидное золото – метка, широко используемая в колориметрическом ИХА [24]. Были получены наномаркеры двух типов, различающиеся по форме и размерным характеристикам, – сферические наночастицы и так называемые наноцветы. Сферические наночастицы золота были синтезированы одностадийным восстановлением $HAuCl_4$ цитратом натрия. Соотношение реагентов и время реакции было выбрано с целью получения НЧЗ диаметром 30 нм. Нанодисперсный носитель такого размера оптимален в иммунохроматографии, поскольку обеспечивает высокий аналитический сигнал и хорошую сорбционную емкость [25].

Препарат был изучен методом ПЭМ. Полученные данные (рис. 1) свидетельствуют о том, что синтезированные НЧЗ были гомогенны, имели округлую форму и характеризовались средним размером 31.7 ± 5.6 нм (минимальный диаметр наночастиц составлял 18.18 нм, максимальный диаметр – 59.60 нм). Агрегаты в препарате отсутствовали.

Синтез НЦЗ проводили методом доращивания сферических наночастиц. Для этого к смеси $HAuCl_4$, цитрата натрия и гидрохинона добавляли предварительно синтезированные НЧЗ малого диаметра (около 10 нм), служащие центрами нуклеации. Синтезированные НЦЗ характеризовали спектрально и методом ПЭМ. Согласно полученным спектральным данным (рис. 2), максимум поглощения для НЧЗ (центров нуклеации) составлял 520 нм, а для НЦЗ – 600 нм. Сдвиг максимумов поглощения для НЦЗ в более длинноволновую область по сравнению с НЧЗ свидетельствовал об образовании более крупных наночастиц. Характеристика препарата НЦЗ методом ПЭМ показала, что он содержит одиночные наночастицы с игольчатой поверхностью. Размер частиц варьировал в пределах 80–90 нм.

Иммунохимические свойства моноклональных антител к MC-LR были охарактеризованы методом непрямого ИФА. В данном формате свободный определяемый MC-LR в растворе и иммобилизованный микроцистин в составе белкового конъюгата конкурентно взаимодействовали со специфическими антителами. Согласно полученной конкурентной кривой определения MC-LR (рис. 3), ПО микроцистина в ИФА составил 0.01 нг/мл. Продемонстрированная высокая чувствительность детекции MC-LR в ИФА подтвердила возможность разработки экспрессного иммуноанализа с использованием данного клона антител.

Полученные НЧЗ и НЦЗ конъюгировали с антивидовыми антителами методом физической адсорбции. Предварительно была выбрана оптимальная концентрация АК для получения конъюгата. Для этого была получена флоккуляционная кривая зависимости ОП конъюгата АК–НЧЗ от концентрации иммобилизованных антител в среде, содер-

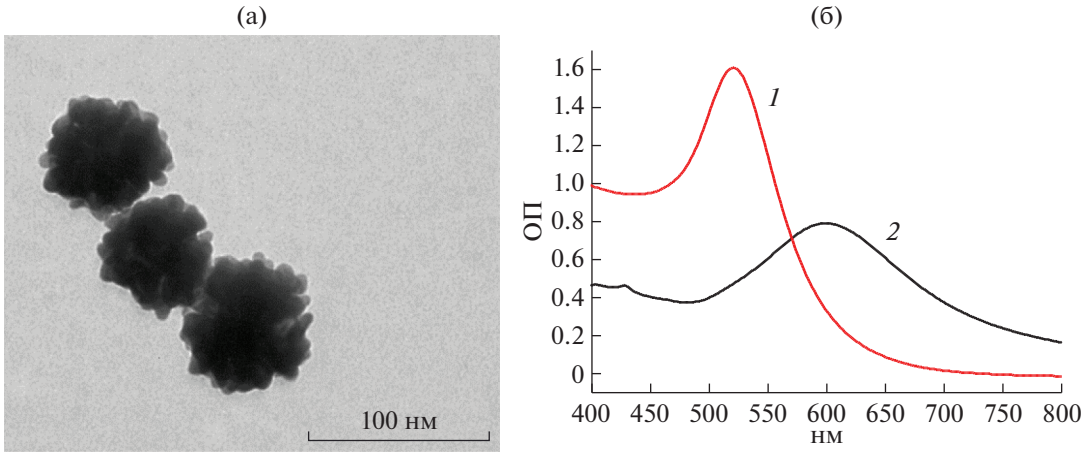


Рис. 2. Характеристика НЦЗ методом ПЭМ (а) и спектрально (б): *1* – исходные НЧЗ; *2* – НЦЗ.

жащей коагулирующий агент. Адсорбированные на поверхности НЧЗ иммуноглобулины обуславливали их стабилизацию, предотвращая агрегацию при добавлении коагулянта. При концентрации антител, равной 6 мкг/мл, зависимость ОП выходила на плато, что свидетельствовало о стабилизации НЧЗ молекулами иммуноглобулинов [21]. При меньших концентрациях антител НЧЗ дестабилизировались и флоккулировали, о чем свидетельствовал рост ОП. Поэтому данная концентрация и была выбрана для конъюгации антител с НЧЗ и НЦЗ.

Разработка ИХА микроцистина. В работе был реализован непрямой формат ИХА микроцистина, в котором введение наномаркера в аналитическую систему осуществлялось посредством конъюгации с антивидовыми антителами. Для непрямого ИХА на рабочей мембране тест-полоски формировали две зоны – аналитическую и контрольную с иммобилизацией белкового конъюгата MC-LR и антивидовых антител соответственно. ИХА включал две стадии: предварительную инкубацию пробы, содержащей MC-LR, со специфическими антителами, а затем инкубацию тест-полоски с этой смесью. Если MC-LR в образце отсутствует, специфические антитела связываются с меченными золотом антивидовыми антителами, иммобилизованными на стекловолоконной мембране, а затем этот комплекс перемещается в аналитическую зону и концентрируется там с образованием первой окрашенной линии. При наличии MC-LR в пробе последний взаимодействует с антителами, блокируя их активные центры и препятствуя связыванию с конъюгатом MC-LR–БСА. Следовательно, окрашивания в аналитической зоне тест-полоски не происходит.

Протокол анализа был оптимизирован для достижения минимального предела обнаружения MC-LR. Оптимизация включала выбор концентраций иммунореагентов на рабочей мембране и в растворе, а также продолжительности стадий анализа. Концентрацию адсорбированного конъюгата MC-LR–БСА варьировали в диапазоне 0.2–1.2 мг/мл, меченные НЧЗ и НЦЗ антивидовые антитела наносили на стекловолоконную мембрану в диапазоне концентраций, соответствующих $ОП_{520}$ = 0.5–3.5, а АО иммобилизовали в диапазоне концентраций 0.5–1 мг/мл. Время предынкубации образца, содержащего MC-LR, со специфическими антителами варьировали от 2 до 10 мин, а время инкубации тест-полоски с пробой – от 8 до 20 мин. Было показано, что минимальный ПО MC-LR достигался при концентрациях MC-LR–БСА и АО, равных 0.75 и 0.5 мг/мл

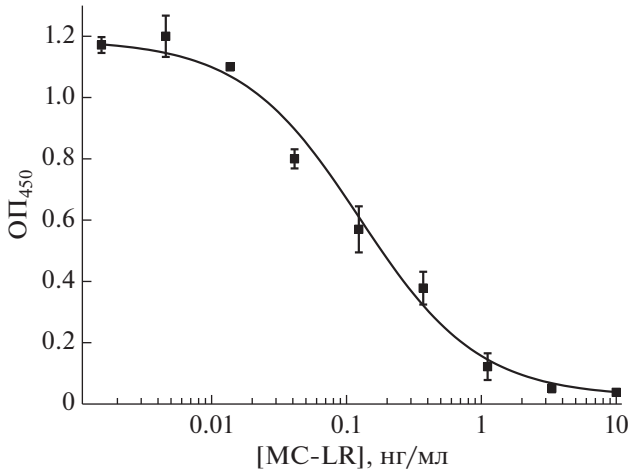


Рис. 3. Конкурентная кривая определения MC-LR в ИФА.

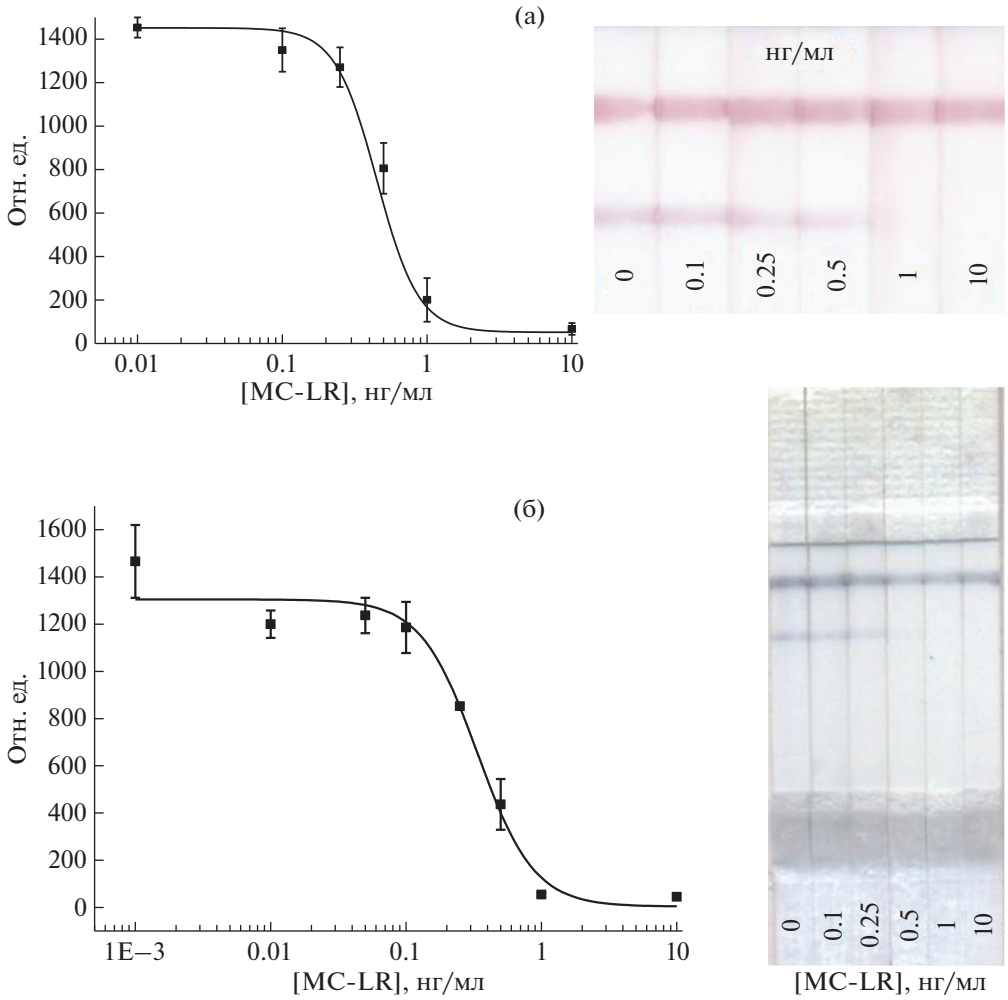


Рис. 4. Калибровочные кривые определения MC-LR в ИХА с использованием НЧЗ (а) и НЦЗ (б) и соответствующие тест-полоски (n = 3).

соответственно, и количестве конъюгатов АК–НЧЗ и АК–НЦЗ, соответствующем $ОП_{520}$ = 2.0. Оптимальная продолжительность первой стадии ИХА (предынкубация антител с MC-LR) составила 3 мин, второй – 15 мин.

Калибровочные кривые MC-LR, полученные в оптимизированных условиях, представлены на рис. 4. Инструментальные ПО/рабочие диапазоны определяемых концентраций MC-LR составили 0.20/0.33–0.77 нг/мл и 0.10/0.17–0.65 нг/мл для ИХА с использованием НЧЗ и НЦЗ соответственно. Визуальные ПО составили 1 нг/мл в обоих случаях, время анализа – 18 мин. Таким образом, сопоставление наночастиц золота разного размера и формы показало, что минимальный предел обнаружения MC-LR обеспечивается при использовании НЦЗ. При реализации ИХА с НЦЗ был достигнут двукратный выигрыш в чувствительности анализа.

Апробация иммунохроматографических тест-систем. Полученные данные позволили перейти к апробации разработанных тест-систем для контроля фикотоксина в реальных пробах, контаминированных MC-LR. Были охарактеризованы пробы рыбы (треска), мидий, креветок, осьминогов и кальмаров. Поскольку компоненты матрикса данных проб могут влиять на результаты тестирования, необходима пробоподготовка, обеспечивающая экстракцию фикотоксина, с одной стороны, и нивелирование влияния компонентов проб на результаты ИХА, с другой стороны. Предложенная процедура пробоподготовки состояла из гомогенизации проб с добавленным известным количеством MC-LR, экстракции аналита водно-органической смесью, центрифугирования и выпаривания экстрактов.

В результате проведенной апробации было показано, что тест-системы позволяли качественно

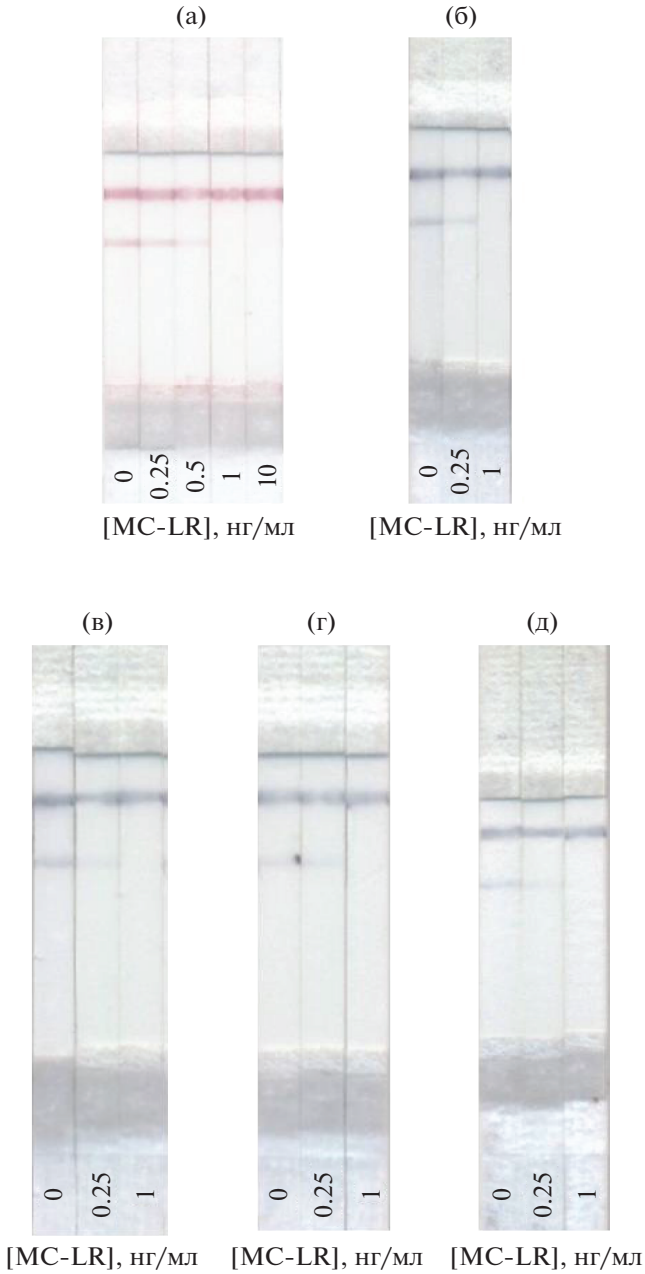


Рис. 5. Изображения тест-полосок после ИХА MC-LR в реальных пробах: а – детекция в рыбе (маркер – НЧЗ); б – детекция в креветках (маркер – НЦЗ); в – детекция в осьминогах (маркер – НЦЗ); г – детекция в кальмарах (маркер – НЦЗ); д – детекция в мидиях (маркер – НЦЗ).

определять микроцистин в контаминированных пробах (рис. 5). На тест-полосках регистрируется исчезновение окрашенной линии в аналитической зоне, коррелирующее с увеличением концентрации MC-LR в пробах. Таким образом, проведенная апробация ИХА показала пригодность разработанных тест-систем для определения фикотоксина в морепродуктах.

Авторы выражают благодарность Н.А. Тарановой (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в синтезе препаратов НЦЗ и С.М. Придворовой (ФИЦ Биотехнологии РАН) за получение электронных микрофотографий НЧЗ и НЦЗ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-43-07001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thompson L.A., Darwish W.S.* // J. Toxicol. 2019. Article 2345283. https://www.hindawi.com/journals/jt/2019/2345283/
2. *Pham T.L., Utsumi M.* // J. Environ. Manage. 2018. V. 213. P. 520–529.
3. *Rastogi R.P., Sinha R.P., Incharoensakdi A.* // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2014. V. 13. №. 2. P. 215–249.
4. *Flores N.M., Miller T.R., Stockwell J.D.* // Front. Mar. Sci. 2018. V. 5. №. 30. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00030/full
5. *Abeysiriwardena N.M., Gascoigne S.J.L., Anandappa A.* // Yale J. Biol. Med. 2018. V. 91. № 2. P. 129–142.
6. *Fessard V., Le Hegarat L.* // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 397. № 5. P. 1715–1722.
7. *Preece E.P., Hardy F.J., Moore B.C., Bryan M.* // Harmful Algae. 2017. V. 61. P. 31–45.
8. *Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., D'Arco G., Giraudi G.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 2–3. P. 467–480.
9. *Kim Y.M., Oh S.W., Jeong S.Y., Pyo D.J., Choi E.Y.* // Environ. Sci. Technol. 2003. V. 37. № 9. P. 1899–1904.
10. *Zhang Y., Ding X.L., Guo M.M., Han T.T., Huang Z.J., Shang H.T., Huang B.* // Anal. Methods. 2017. V. 9. № 45. P. 6430–6434.
11. *Sun J., Li Y., Pi F., Ji J., Zhang Y., Sun X.* // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. № 8. P. 2213–2220.
12. *Liu Y., Ji J., Cui F., Sun J., Wu H., Pi F., Zhang Y., Sun X.* // Food Control. 2019. V. 95. P. 34–40.
13. *Akter S., Kustila T., Leivo J., Muralitharan G., Vehniainen M., Lamminmaki U.* // Biosensors. 2019. V. 9. № 2. P. 14672–14685.
14. *Pyo D.J., Kim T.* // Algae. 2013. V. 28. P. 289–296.
15. *Pyo D., Choi J., Hong J., Oo H.H.* // J. Immunoas. Immunochem. 2006. V. 27. № 4. P. 291–302.
16. *Liu L., Xing C., Yan H., Kuang H., Xu C.* // Sensors. 2014. V. 14. № 8. P. 14672–14685.
17. *Xing C., Liu L., Song S., Feng M., Kuang H., Xu C.* // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 66. P. 445–453.
18. *Melnik S., Neumann A.C., Karongo R., Dirndorfer S., Stubler M., Ibl V., Niessner R., Knopp D., Stoger E.* // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. № 1. P. 27–38.
19. *Eustis S., el-Sayed M.A.* // Chem. Soc. Rev. 2006. V. 35. P. 209–217.
20. *Petrakova A.V., Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Anal. Biochem. 2019. V. 568. P. 7–13.
21. *Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Anal. Methods. 2020. V. 12. P. 392–400.
22. *Frens G.* // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
23. *Uhrovcik J.* // Talanta. 2014. V. 119. P. 178–180.
24. *Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г.* // Успехи биол. химии. 2016. Т. 56. С. 411–450.
25. *Huang X., Aguilar Z.P., Xu H., Lai W., Xiong Y.* // Biosensors & Bioelectronics. 2016. V. 75. P. 166–180.

Immunochromatographic Test Systems for the Detection of Microcystin-LR in Seafood

E. A. Zvereva[a], O. D. Hendrickson[a], A. V. Zherdev[a, *], and B. B. Dzantiev[a]

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

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

For the rapid control of the highly toxic phycotoxin microcystin-LR in seafood, immunochromatographic test systems have been developed and compared using two types of gold nanoparticles as markers – spherical particles and particles with a developed surface ("nanoflowers"). The functioning of the test systems is based on an indirect competitive assay, in which the detectable immune complexes include native microcystin-specific microcystin-LR antibodies and nanoparticle-labeled anti-species antibodies. The developed test systems allow the detection of microcystin-LR for 18 min with instrumental detection limits equal to 0.2 and 0.1 ng/mL when using spherical nanoparticles and gold nanoflowers, respectively. The visual detection limit was 1 ng / ml for both regimens. The parameters of nanoparticles, which determine the analytical characteristics of test systems with their use, are characterized. The suitability of the developed test systems for the control of contamination of fish and seafood samples (shrimp, octopus, squid, mussels), combining rapid stages of sample preparation and immunochromatography, has been shown.

Keywords: phycotoxins, microcystin-LR, immunochromatographic analysis, food safety

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 57, № 3, с. 311–312

ЛОГИНОВ ОЛЕГ НИКОЛАЕВИЧ (17.05.1963–21.12.2020)

21 декабря 2020 г. на 58-м году жизни скончался известный ученый в области прикладной микробиологии, биохимии и биотехнологии, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Уфимского Института биологии УФИЦ РАН Логинов Олег Николаевич.

Олег Николаевич родился 17 мая 1963 г. в г. Уфе в семье служащих. В 1985 г. закончил с отличием Уфимский нефтяной институт по специальности "Технология микробиологических производств", в 1987 г. поступил в аспирантуру при Институте биологии Башкирского филиала АН СССР и в 1991 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук. С 1991 по 2001 г. работал в Институте биологии Уфимского научного центра РАН, трудовую деятельность в котором начал с должности младшего научного сотрудника. В 1997 г. был назначен заведующим лабораторией биологически активных веществ (с 2017 г. переименована в лабораторию биотехнологий) Института биологии Уфимского научного центра РАН. В 2004 г. О.Н. Логинов защитил докторскую диссертацию и в 2006 г. получил ученое звание профессора.

Значительный период своей жизни (2001–2009 гг.) Олег Николаевич посвятил работе Генеральным директором ГУП "Опытный завод Академии наук Республики Башкортостан", во время которой наладил промышленное производство биопрепаратов для нужд сельского хозяйства и природоохранной деятельности, разработанных в Институте биологии УНЦ РАН. При этом он продолжал вести активную научную работу и в 2009 г. вернулся на должность заведующего лабораторией биологически активных веществ Института биологии УНЦ РАН.

В 2019 г. О.Н. Логинов оставил руководство лабораторией в связи с переходом на должность заместителя Председателя УФИЦ РАН по научной работе, но оставался активно действующим ученым.

О.Н. Логинов автор более 350 публикаций, среди них 56 авторских свидетельств СССР и патентов РФ, а также 6 монографий, в числе которых "Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней" (2001 г.), "Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии" (2005), "Биорекультивация: микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов" (2009 г.) и "Бактерии рода *Pseudomonas* для агробиотехнологии и природоохранной деятельности" (2020 г.). Олег Николаевич всегда уделял большое внимание подготовке научных кадров. Под его руководством и при научном консультировании защищено 15 диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и 3 диссертации на соискание ученой степени доктора наук. О.Н. Логинов вел, в том числе, и образовательную работу: читал курсы лекций для студентов и профессорско-преподавательского состава биологического факультета ФГБОУ ВО "Башкирский государственный университет"; неоднократно был председателем и членом Государственной аттестационной комиссии в ФГБОУ ВО "Уфимский государственный нефтяной технический университет" и ФГБОУ ВО "Башкирский государственный университет". По приглашению Министерства сельского хозяйства Республики Башкортостан неутомимо проводил лекционно-просветительскую работу среди работников агропромышленного комплекса, являясь членом Научно-технического совета Минсельхоза РБ (секция по внедрению современных технологий в растениеводстве).

О.Н. Логинов активно занимался экспертной деятельностью, будучи аккредитованным в Федеральном реестре экспертов научно-технической сферы и являясь экспертом РАН. На протяжении многих лет он был членом редколлегии нескольких научных журналов и, помимо этого, популяризировал достижения науки среди широких слоев населения.

Как ученого Олега Николаевича характеризовала блестящая эрудиция, целеустремленность, огромная работоспособность. Сфера его научных интересов была очень разнообразна. В нее входила биохимия, микробиология, агро- и экобиотехнология. Под его руководством и при непосредственном участии были обнаружены новые метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*, угнетающие развитие фитопатогенов сельскохозяйственных растений; открыт и таксономически узаконен новый вид микроорганизмов *Pseudomonas turukhanskensis*; установлено молекулярное строение экзополисахаридов, продуцируемых штаммами рода *Paenibacillus* и разработан способ производства

высокостабильных биополимеров альгинатного типа на их основе. За разработки в области биогеотехнологии коллективу молодых ученых и их руководителю О.Н. Логинову была присуждена Премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

Олег Николаевич был не только теоретиком науки, он был редким типом ученого-практика, который активно внедрял в производство и применение биопрепараты, разработанные в руководимой им лаборатории: “Елена” и “Азолен”® для борьбы с болезнями растений и повышения их урожайности; микробные композиции для утилизации сельскохозяйственных отходов и получения эффективных органо-минеральных удобрений; серию биопрепаратов-нефтедеструкторов “Ленойл”® для ликвидации последствий нефтяного загрязнения почв, грунтов, водных объектов и обезвреживания нефтесодержащих отходов в различных климатических условиях. Работы Олега Николаевича хорошо известны в нашей стране и за рубежом.

За большой вклад в развитие науки, организацию и проведение научных исследований, реализацию научных результатов на практике Олег Николаевич был награжден Почетной грамотой РАН и Профсоюза работников РАН.

Светлая память об Олеге Николаевиче Логинове навсегда сохранится в сердцах его коллег и учеников, которые ценили его как талантливого ученого, успешного организатора, способствовавшего развитию биотехнологии в Республике Башкортостан.

УИБ УФИЦ РАН
Редколлегия журнала