

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 1, 2020

Роль фосфат-аккумулирующих бактерий в биологической очистке сточных вод от фосфора (обзор) <i>А. Г. Дорофеев, Ю. А. Николаев, А. В. Марданов, Н. В. Пименов</i>	3
Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) <i>И. В. Максимов, Б. П. Сингх, Е. А. Черепанова, Г. Ф. Бурханова, Р. М. Хайруллин</i>	19
Конформация макромолекул полимера-носителя и активность иммобилизованного фермента <i>И. Л. Валувев, Л. В. Ванчугова, Л. И. Валувев</i>	35
Очистка протеазы – активатора протеина с плазмы крови человека, продуцируемой микромицетом <i>Aspergillus ochraceus</i> ВКМ F-4104D <i>С. К. Комаревцев, Е. А. Попова, В. Г. Крейер, К. А. Мирошников, А. А. Осмоловский</i>	39
Клонирование генов нуклеозидфосфорилаз из экстремофильной бактерии <i>Halomonas chromatireducens</i> AGD 8-3, конструирование рекомбинантных штаммов-продуцентов этих белков и исследование их ферментативных свойств <i>А. Н. Антипов, Н. Н. Мордкович, Т. В. Хижняк, Н. А. Окорокова, В. П. Вейко</i>	45
Скрининг условий рефолдинга и получение рекомбинантного антистафилококкового эндолизина LysK <sub>CA</sub> в активной форме из телец включения <i>E. coli</i> <i>А. В. Жидецкий, С. Г. Голенченко, В. А. Прокулевич, М. В. Шолух</i>	52
Влияние условий культивирования на синтез поли-3-гидроксibuтирата клубеньковыми бактериями <i>Rhizobium phaseoli</i> <i>О. В. Космачевская, Е. В. Осипов, Чан Ван Ти, Фам Тхи Туэт Май, А. Ф. Топунов</i>	60
Определение мицелия и антигенов ряда видов микромицетов в почвенных экстрактах методом иммуноферментного анализа <i>А. Е. Иванова, А. С. Шутова, А. В. Ганнесен, Ю. С. Лебедин, С. А. Ерёмин</i>	69
Влияние состава питательного субстрата и продолжительности культивирования на продуктивность, биологическую активность и хроматографические профили экстрактов <i>Stagonospora cirsii</i> S-47 <i>А. О. Берестецкий, М. Ю. Белозерова, Д. С. Прокофьева</i>	76
Омхохромы <i>Hermetia illucens</i> : получение, исследование антиоксидантных характеристик и антимикробной активности <i>А. Е. Донцов, Н. А. Ушакова, В. С. Садыкова, А. И. Бастраков</i>	90
Анализ взаимодействия фаговых антител с комплементарными антигенами клеток <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 электрооптическим датчиком <i>О. И. Гулий, Н. С. Величко, Ю. П. Федоненко, В. Д. Бунин</i>	96

# CONTENTS

---

---

Vol. 56, No. 1, 2020

---

---

Role of Phosphate-Accumulating Bacteria in Biological Waste Water Treatment from Phosphorus <i>A. G. Dorofeev, Yu. A. Nikolaev, A. V. Mardanov, and N. V. Pimenov</i>	3
Prospects of Application of Lipopeptides Producers Bacteria for Plant Protection (Review) <i>I. V. Maksimov, B. P. Singh, E. A. Cherepanova, G. F. Burkhanova, and R. M. Khairullin</i>	19
Conformation of Polymer-Carrier Macromolecules and Activity of Immobilized Enzyme <i>I. L. Valuev, L. V. Vanchugova, and L. I. Valuev</i>	35
Purification of the Protease-Activator of Protein from Human Blood Plasma Produced by the Micromicette <i>Aspergillus ochraceus</i> VKM F-4104D <i>S. K. Komarevtsev, E. A. Popova, V. G. Kreyer, K. A. Miroshnikov, and A. A. Osmolovskiy</i>	39
Cloning of Nucleoside Phosphorylase Genes from the Extremophilic Bacterium <i>Halomonas chromatireducens</i> AGD 8-3, Constructing Recombinant Strains-Producers of These Proteins and Studying Their Enzymatic Properties <i>A. N. Antipov, N. N. Mordkovich, T. V. Khijniak, N. A. Okorokova, and V. P. Veiko</i>	45
Screening the Refolding Conditions and Receiving the Recombinant Anti-Staphylococcal Endolysin LysK <sub>CA</sub> in Active Form from <i>E. coli</i> Inclusion Bodies <i>A. V. Žydziecki, S. G. Golenchenko, V. A. Prakulevich, and M. V. Sholukh</i>	52
Influence of Cultivation Conditions on the Synthesis of Poly-3-hydroxybutyrate by Nodulating Bacteria <i>Rhizobium phaseoli</i> <i>O. V. Kosmachevskaya, E. V. Osipov, Tran Van Chi, Pham Thi Tuyet Mai, and A. F. Topunov</i>	60
Determination of the Mycelium and Antigens of a number of Micromycetes in Soil Extracts by the Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay <i>A. E. Ivanova, A. S. Shutova, A. V. Gannesen, Y. S. Lebedin, and S. A. Eremin</i>	69
Effects of Substrate and Duration of Cultivation on Productivity, Biological Activity, and Chromatography Profiles of Extracts Obtained from <i>Stagonospora cirsii</i> S-47 <i>A. O. Berestetskiy, M. Yu. Belozorova, and D. S. Prokof'eva</i>	76
Ommochromes from <i>Hermetia illucens</i> : Isolation, Research of Antioxidant Characteristics and Antimicrobial Activity <i>A. E. Dontsov, N. A. Ushakova, V. S. Sadykova, and A. I. Bastrakov</i>	90
Analysis the Interaction of the Phage Antibodies with Complete Antigens of <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 Cells by an Electro-Optical Sensor <i>O. I. Guliy, N. S. Velichko, Yu. P. Fedonenko, and V. D. Bunin</i>	96

---

---

УДК 579.695:628.35

## РОЛЬ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКЕ СТОЧНЫХ ВОД ОТ ФОСФОРА (ОБЗОР)

© 2020 г. А. Г. Дорофеев<sup>1, 2, \*</sup>, Ю. А. Николаев<sup>1</sup>, А. В. Марданов<sup>3</sup>, Н. В. Пименов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>АО “Мосводоканал”, Москва, 105005 Россия

<sup>3</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр

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

\*e-mail: DorofeevAG@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2019 г.

После доработки 24.07.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Обзор посвящен микробиологическим аспектам биологического удаления фосфора из сточных вод. Кратко изложена история становления биотехнологии и открытия физиологической группы фосфат-аккумулялирующих бактерий (ФАО), осуществляющих биологическое удаление фосфора путем поглощения фосфатов и запасаания их в виде внутриклеточных полифосфатов. Для ФАО характерен циклический тип метаболизма, реализующийся при циклической смене анаэробных/аэробных условий. В анаэробных условиях ФАО поглощают и запасают органические соединения за счет энергии деградации внутриклеточных полифосфатов. При смене анаэробных условий на аэробные или появлении альтернативного акцептора электронов, ФАО поглощают фосфаты и синтезируют внутриклеточные полифосфаты, используя для этих процессов накопленные в анаэробных условиях внутриклеточные полимерные источники углерода и энергии. Описаны основные представители ФАО, их метаболические модели и физиологические особенности. Рассмотрены основные принципы реализации биотехнологии, использующиеся в практике очистки сточных вод от фосфора и других биогенных элементов.

*Ключевые слова:* биологическое удаление фосфора, фосфат-аккумулялирующие организмы, *Candidatus Accumulibacter phosphatis*

DOI: 10.31857/S0555109920010055

Фосфор – биогенный элемент, играющий ключевую роль во многих природных и искусственных экосистемах. Интенсификация его добычи и использования для обеспечения растущего населения сельскохозяйственной продукцией привела к возникновению двух масштабных проблем:

– массовой эвтрофикации водоемов, вызванной увеличением в них концентрации фосфора из-за увеличения его сброса со сточными водами [1];

– опасности возникновения в ближайшие десятилетия глобального дефицита фосфора в связи с ограниченностью и невозобновляемостью его минеральных запасов [2].

Возможные пути решения этих проблем – разработка и внедрение реализуемых на практике и экономически обоснованных технологий реутилизации фосфора, обеспечивающих: (1) его извлечение из сточных вод до экологически безопасного уровня и (2) перевод извлеченного

фосфора в товарный продукт для повторного использования [1, 3].

Существует множество путей очистки сточных вод от фосфора, наиболее распространенные из них – физико-химический, биологический и комбинированный [4, 5]. Считается, что наиболее эффективный и экономически привлекательный путь извлечения фосфора с последующей реутилизацией (по крайней мере, на крупных сооружениях очистки муниципальных сточных вод) – внедрение технологий, основанных на биологическом удалении фосфора и комбинаций биологического удаления с химическим осаждением [3, 6, 7]. В настоящей работе используется устоявшийся в отечественной литературе термин “биологическое удаление фосфора”, соответствующий англоязычному термину “Enhanced biological phosphorus removal”, в котором подчеркивается тот факт, что удаление фосфора улучшено (Enhanced) в результате протекания особых биологических процессов.

**История изучения процесса биологического удаления фосфора и выделение группы фосфат-аккумулирующих микроорганизмов.** Впервые биологическое удаление фосфора активным илом было отмечено группой исследователей из Индии в 1959 г. [8], обнаружившей, что при определенных условиях активный ил очистных сооружений способен накапливать фосфор в количестве, существенно превышающем потребности в фосфоре обычной микробной биомассы. Было также продемонстрировано, что это явление имеет биологическую природу (подавляется тепловой обработкой, ингибируется токсичными веществами, требует аэрации).

В дальнейшем систематические исследования активного ила на сооружениях биологической очистки и в лабораторных условиях позволили установить основные условия биологического удаления фосфора, разработать и внедрить первые технологии биологической очистки сточных вод от фосфора, часть из которых не потеряла актуальность до сих пор [9–13]. Несмотря на отсутствие на этом этапе детальной биохимической картины процесса, был определен основной принцип биологического удаления фосфора: создание для активного ила чередования анаэробно-за с наличием легкодоступного органического вещества (главным образом, летучих жирных кислот) и аэробных или аноксидных условий без легкодоступного органического вещества. В соответствии с общепринятой в области очистки сточных вод терминологией, под аноксидными условиями мы понимаем отсутствие в среде кислорода, но присутствие конечных акцепторов электронов в форме нитратов и (или) нитритов. Такая смена обеспечивала потребление органического вещества и выброс фосфатов из активного ила в анаэробной фазе, а затем, при поступлении кислорода или других акцепторов электронов потребление фосфатов. При этом в аэробный период поглощается фосфатов больше, чем выбрасывается в анаэробный, что приводит к снижению их концентрации в сточной воде в конце аэробного периода (рис. 1) [14]. В аэробной фазе происходит обогащение активного ила фосфором: если в обычном активном иле количество фосфора составляет около 0.015 мг Р/мг взвешенных веществ (ВВ), то в обогащенном – до 0.05–0.1 мг Р/мг ВВ [15]. В большинстве технологий удаление фосфора заключается в его выведении из системы в конце аэробного периода вместе с активным илом (т. н. “избыточным активным илом”), обогащенным фосфором.

Уже ранние исследования активных илов, осуществляющих удаление фосфора, привели к заключению о микробиологическом характере этого процесса и к выделению особой физиологической группы организмов, его осуществляющих – “фосфат-аккумулирующих организмов” (ФАО) [16, 17].

**Основные признаки ФАО.** В клетках многих прокариот и эукариотных организмов обнаруживаются полифосфаты, существующие как в свободном состоянии, так и в связанном, в виде комплексов с катионами, белками и нуклеиновыми кислотами. Первоначально предполагалось, что функции этих полимеров ограничиваются созданием биохимического резерва фосфатов и внутриклеточного запаса энергии, однако впоследствии было установлено, что полифосфаты играют важную роль и в других процессах – регуляции активности ферментов, контроле экспрессии генов, отвечающих за устойчивость к стрессовым условиям и голоданию, участвуют в мембранном транспорте, образовании клеточных оболочек [18, 19].

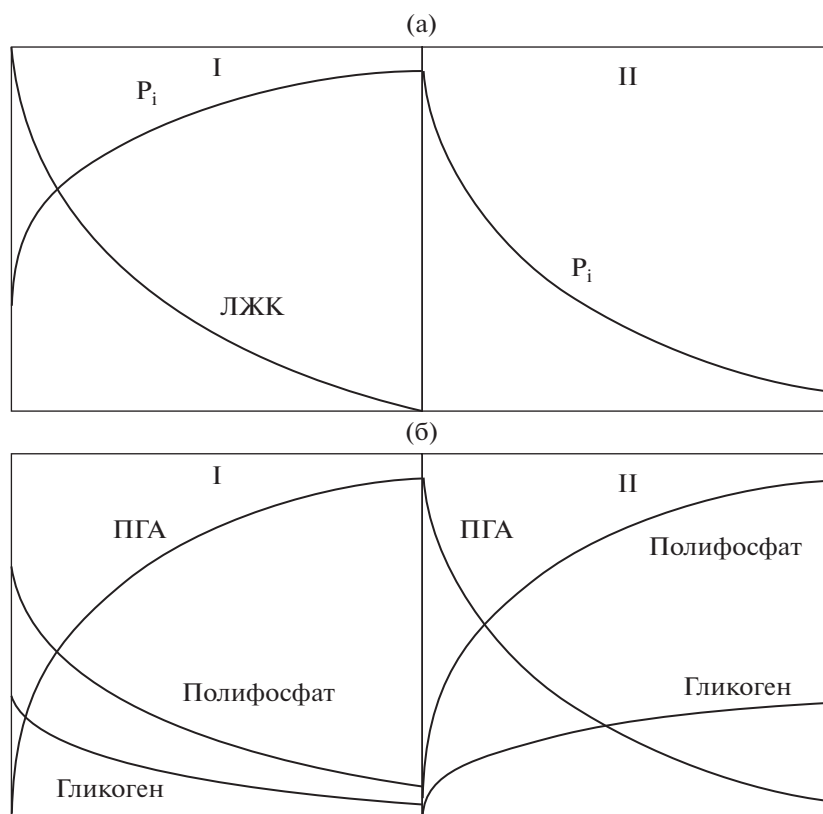
Среди полифосфат-содержащих микроорганизмов была выделена группа ФАО, представители которой осуществляют удаление фосфора из сточных вод за счет способности к внутриклеточному накоплению фосфора в количествах, существенно выше необходимого для обеспечения жизнедеятельности обычных гетеротрофных бактерий (до 0.38 мг Р/мг сухого беззольного вещества [20–22]). Особенности этой группы микроорганизмов проявляются при циклической смене условий среды, задающейся в биореакторах для осуществления биологического удаления фосфора. К ФАО изначально были отнесены аэробные микроорганизмы, характеризующиеся следующими свойствами [23–25] (рис. 1).

1. Способностью в анаэробных условиях, поглощать легкоусвояемые органические соединения и запасать их в форме внутриклеточных полимеров (главным образом, полигидроксиалканоев, ПГА), одновременно с деградацией внутриклеточных полифосфатов и выбросом фосфатов в среду. Основные органические субстраты для ФАО – летучие жирные кислоты (ацетат и пропионат), трансформируемые в ПГА.

2. Способностью в аэробных условиях и (или) наличии альтернативного акцептора электронов (нитратов или нитритов) поглощать ортофосфаты и синтезировать внутриклеточные полифосфаты, используя для этих процессов накопленные в анаэробных условиях внутриклеточные полимерные источники углерода и энергии. В этих условиях происходит рост биомассы клеток.

Отметим, что открытие группы ФАО высветило необычную особенность микробной физиологии: оказалось, что в анаэробных условиях могут активно функционировать строго аэробные микроорганизмы [23]. Цикличность явлений, протекающих в метаболических процессах, связанных с удалением фосфора послужило основой для выделения нового способа микробного существования – циклического типа метаболизма [26].

**Основная биохимическая модель и соответствующие ей представители ФАО.** Осуществляющие



**Рис. 1.** Цикл биологического удаления фосфора. Концентрация в сточной воде внеклеточных ортофосфатов ( $P_i$ ) и летучих жирных кислот (ЛЖК) (а) и внутриклеточного содержания ПГА, полифосфатов и гликогена (б) в анаэробный период с наличием легкодоступного органического вещества (I) и аэробный период (или при наличии в среде нитратов или нитритов) без легкодоступного органического вещества (II).

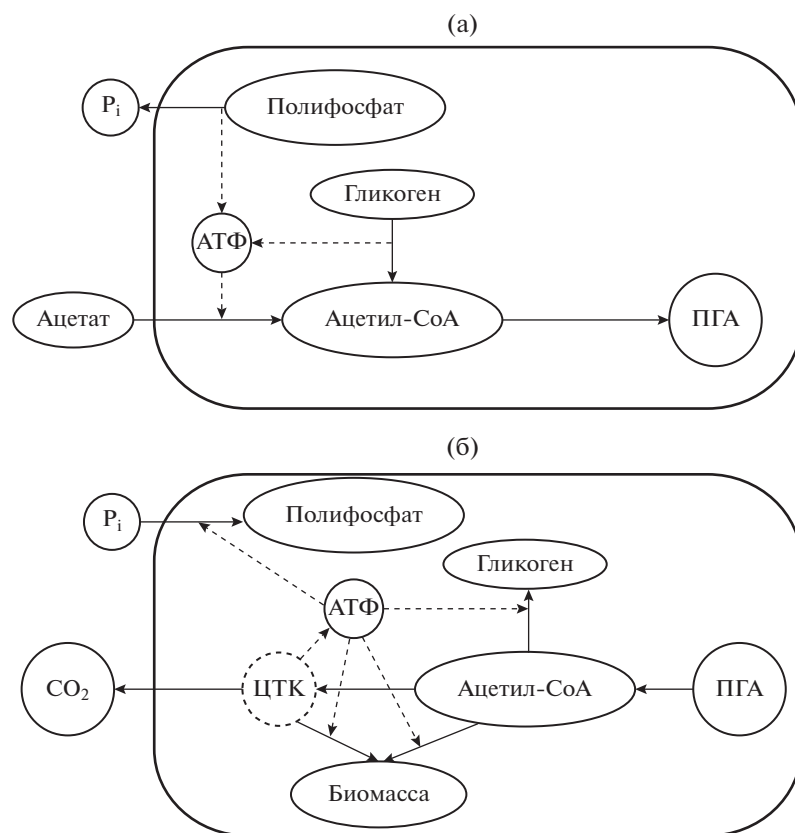
ФАО биохимические процессы до конца не детализированы, что связано с отсутствием чистых культур основных представителей ФАО и разнообразием путей метаболизма бактерий этой группы. На основании ранних исследований активного ила промышленных сооружений, а также лабораторных работ с обогащенными ФАО культурами были разработаны две основные биохимические модели метаболизма ФАО: модель Мино [27, 28] и модель Кома и Вентцеля [29, 30]. В настоящее время модель Мино считается доминирующей, хотя результаты ряда исследований показывают возможность существования обоих механизмов, величина вклада которых в суммарный процесс может зависеть от внешних условий и физиологического состояния клеток ФАО [31, 32]. Согласно модели Мино (рис. 2), ФАО относятся к аэробным гетеротрофным организмам, способным в анаэробных условиях поглощать летучие жирные кислоты (ацетат и пропионат) и запасать их в виде поли- $\beta$ -гидроксиалканоатов. Основным источником энергии в анаэробных условиях – гидролиз внутриклеточных полифосфатов. Образующиеся ортофосфаты выбрасываются из клеток параллельно с выходом контр-ионов ( $Mg^{2+}$  и  $K^+$ ) в со-

отношении  $P : Mg^{2+} : K^+ = 1 : 0.33 : 0.33$ . НАДН, необходимый для синтеза ПГА в анаэробных условиях, образуется при распаде гликогена, регенерирующегося в аэробных условиях. Источниками энергии в анаэробной стадии служит как гидролиз полифосфатов, так и катаболизм гликогена.

В аэробной фазе происходит катаболизм внутриклеточных ПГА, синтез на продуктах их распада “обычной” биомассы ФАО и регенерация гликогена. В аэробной фазе происходит поглощение ортофосфатов, сопряженное с переносом ионов  $Mg^{2+}$  и  $K^+$ , и создание внутриклеточного пула полифосфатов.

Общепризнанным представителем ФАО считается “*Candidatus Accumilibacter phosphatis*”, входящий в семейство *Rhodocyclaceae* класса *Betaproteobacteria* [33]. “*Ca. Accumilibacter phosphatis*” относят к некультивируемому микроорганизму, и в чистой культуре его до сих пор выделить не удалось.

Результаты исследований микробных сообществ активного ила и обогащенных ФАО лабораторных культур указывают на то, что во многих случаях именно “*Ca. Accumilibacter phosphatis*” играет доминирующую роль в процессе биологи-



**Рис. 2.** Основная модель метаболизма ФАО в анаэробный (а) и аэробный (предполагающий наличие акцептора электронов) период (б).

ческого удаления фосфора на промышленных очистных сооружениях, и метаболизм этих бактерий полностью соответствует основной биохимической модели ФАО [34–40]. Известное местобитание “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” – активные илы сооружений биологической очистки сточных вод, хотя имеются данные о присутствии этих прокариот не только в активном иле, но и в осадках пресноводных водоемов и эстуарий [41].

Установлено, что существует две основные филогенетические группы “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (тип I и тип II), каждая из которых в свою очередь подразделяется на клады: тип I – на клады от IA до IE и тип II на клады от ПА до ПI) [25, 26, 41–44]. Причем показана связь состава ФАО (кладов) с типом очистных сооружений, условиями питания (ацетат или пропионат), но не с географическим положением [45].

В связи с отсутствием изолятов, исследования “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” в значительной степени связаны с молекулярно-биологическим анализом высокообогащенных ФАО смешанных культур [46–48]. Результаты таких исследований зачастую противоречивы, что может быть объяснено неоднородностью метаболизма этих микро-

организмов, варьированием свойств бактерий с изменением внешних условий, недостаточной степенью обогащения в накопительных культурах. Например, Мартин с совт. [46], анализируя метагеном обогащенной “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” биомассы, обнаружили полный набор генов фиксации азота и фиксации  $\text{CO}_2$ . Однако позднее эти гены были выявлены только у штамма, принадлежащего к типу II, но не типу I [49]. Исследования экспрессии генов цикла трикарбоновых кислот выявили значительные расхождения в анаэробном и аэробном метаболизме различных популяций *Accumulibacter* [50]. Было показано, что представители “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” имеют как общие пути центрального метаболизма углерода и фосфора, так и специфические, связанные со спектром используемых органических субстратов и акцепторов электронов [51]. На основании протеомного анализа было установлено, что анаэробная деградация гликогена у всех изученных *Accumulibacter* осуществляется по пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса [52]. Результаты исследований изменения метатранскриптома в ходе анаэробно/аэробного цикла показали первостепенное значение для *Accumulibacter*

регуляции на уровне транскрипции и возможность использовать более широкий спектр источников углерода, чем предполагалось ранее [53].

Следует отметить, что даже при высокой численности “*Ca. Accumulibacter phosphatis*”, участие этих микроорганизмов в удалении фосфора не всегда находит подтверждение. Например, иногда большинство клеток “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” в удаляющем фосфор активном иле не содержит полифосфатов [54, 55], что косвенно указывает на наличие других микроорганизмов, принадлежащих к группе ФАО и осуществляющих удаление фосфора. Исследования представителей ФАО типа ПА показали, что со снижением внутриклеточного содержания полифосфатов эта группа прокариот способна переключаться на метаболизм, не связанный с аккумулярованием полифосфатов [22], т.е. выпадать из рамок определения ФАО.

С высокой вероятностью к “классическим” ФАО относятся некультивируемые бактерии “*Candidatus Halomonas phosphatis*” (в настоящее время “*Candidatus Accumulimonas spp.*”), обнаруживаемые в активных илах сооружений, работающих по технологиям биологической очистки воды от фосфора [56]. “*Ca. Halomonas phosphatis*” относится к гаммапротеобактериям, способен к запасанию органического вещества в виде ПГА в отсутствие акцепторов электронов, а в аэробных условиях — поглощать ортофосфат с синтезом полифосфатов.

**Представители ФАО с типом метаболизма, отличным от основной метаболической модели.** Модель Мино считается “классической” и удовлетворительно описывает процессы биологического удаления фосфора на многих полномасштабных сооружениях и в лабораторных условиях при работе с культурами, обогащенными “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” — доказанным представителем группы ФАО, осуществляющим процесс очистки сточной воды от фосфора. Однако в результате исследования микрофлоры активных илов современными методами [57] выявляются новые микроорганизмы, метаболически не соответствующие модели Мино, но способные к накоплению полифосфатов и претендующие на участие в очистке сточной воды от фосфора [58, 59]. Поэтому в последние годы наблюдается тенденция к расширению рамок, ограничивающих принадлежность микроорганизмов к ФАО. В частности, увеличился спектр субстратов, используемых микроорганизмами, способными к циклическому потреблению/выбросу фосфатов; у многих кандидатов в группу ФАО обнаружена способность к сбрасыванию и т.д. [40, 58, 59].

Ряд исследователей относят к ФАО грамположительные аэробные актинобактерии *Tetrasphaera*, повсеместно обнаруживаемые в удаляю-

щих фосфор активных илах, но не полностью соответствующие основной модели ФАО [60–63]. Как и “*Ca. Accumulibacter phosphatis*”, эти бактерии в аэробных условиях способны потреблять ортофосфаты и накапливать их в виде внутриклеточного полифосфата при условии, что в предыдущей анаэробной фазе в среде содержался легко усваиваемый органический субстрат. Однако, в отличие от “классической” биохимической модели ФАО, бактерии *Tetrasphaera* в анаэробных условиях ассимилируют целый спектр органических соединений, включая глюкозу и аминокислоты без образования ПГА [64–66]. Группой Кристиансен с соавт. было проведено исследование генома нескольких изолятов *Tetrasphaera*, и создана метаболическая модель этой группы, существенно отличающаяся от “классической” модели ФАО [66]. Согласно этой модели, в анаэробных условиях часть потребляемой глюкозы ферментируется с образованием сукцината и других метаболитов. В качестве запасного вещества *Tetrasphaera* синтезируют гликоген, используя энергию гидролиза полифосфатов и ферментации субстрата. В течение аэробного периода запасенный гликоген катаболизируется, обеспечивая энергией процессы роста и восстановления запасов полифосфата, необходимые для следующего анаэробного цикла развития. Относящиеся к ФАО *Tetrasphaera* способны к денитрификации. Показано, что бактерии группы *Tetrasphaera* в анаэробных условиях способны к поглощению и внутриклеточному накоплению глицина и продуктов его ферментации, которые в аэробных условиях служит источником энергии для биосинтеза, поглощения ортофосфатов и синтеза полифосфатов [67]. В настоящее время из активного ила выделено несколько видов рода *Tetrasphaera*: *T. australiensis*, *T. japonica* [61], *T. elongata* [68, 69], *T. jenkinsii*, *T. vanveenii* и *T. veronensis* [70].

Кандидатом в группу ФАО считаются актинобактерии *Micrococcus phosphovorans* — грамположительные кокковидные неподвижные и не образующих спор прокариоты, характеризующиеся строго аэробным хемоорганотрофным типом обмена. Новый вид использует в анаэробных условиях не ацетат, а сахара, отличаясь от основной модели метаболизма ФАО [71, 72]. В аэробный период цикла *Micrococcus phosphovorans* аккумулирует полифосфаты до 166 мг фосфора/г сухих клеток без внешнего органического источника углерода и энергии [73].

Обобщенная схема метаболических путей *Tetrasphaera* и других ФАО, не соответствующих основной биохимической модели, приведена на рис. 3.

Новый кандидат в группу ФАО — сульфидокисляющие бактерии *Thiothrix caldifontis*, обладающие миксотрофным типом метаболизма, ис-

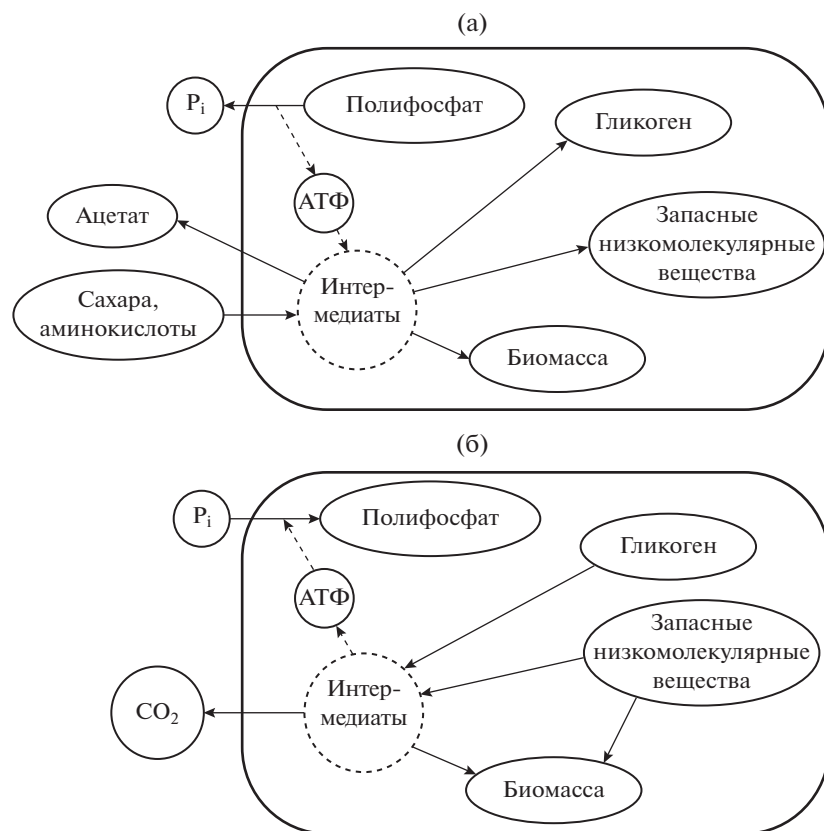


Рис. 3. Основные метаболические пути *Tetrasphaera* и других ферментирующих ФАО в анаэробный (а) и аэробный период (б) [67, 73, 74].

пользующие внутриклеточный пул серы в качестве источника энергии [75, 76]. В циклических аэробно/анаэробных условиях *T. caldifontis* способен в анаэробной фазе запасать углерод в форме ПГА и генерировать требуемую для этого энергию за счет гидролиза полифосфата. В аэробный период происходит утилизация ПГА для роста, поглощения фосфатов с образованием полифосфатов, а также образование гликогена. Культура, обогащенная *T. caldifontis*, способна аккумулировать 100 мг фосфора/г сухого беззольного вещества. Дополнительным источником энергии в этой фазе может быть окисление внутриклеточной серы до сульфата.

С использованием молекулярно-биологических и эко-физиологических методов показана возможность участия в биологическом удалении фосфора и других микроорганизмов, принадлежащих к родам *Dechloromonas* [77, 78], *Gemmatimonas* [79], *Malikia* [80], *Thauera* [81], а также некультивируемых цианобактерий “*Candidatus Obscuribacter phosphatis*” [82]. Однако принадлежность перечисленных бактерий к группе ФАО требует более весомой доказательной базы.

**Стехиометрия биологического удаления фосфора.** Для выяснения путей метаболизма ФАО и оп-

тимизации технологий биологического удаления фосфора большое значение имеет знание стехиометрии и кинетики основных биохимических процессов. Центральный обобщенный стехиометрический показатель метаболизма ФАО – отношение количества выделенного клетками фосфора фосфатов к количеству поглощенного ими в анаэробной стадии органического вещества (Р/С), тогда как наиболее технологически-значимым для очистки воды от фосфора представляется отношение удаляемого фосфора к количеству потребляемого органического субстрата.

В большинстве случаев расчет стехиометрических показателей проводится по технологическим показателям работы промышленных сооружений, осуществляющих биологическое удаление фосфора. Детальные исследования стехиометрических характеристик метаболизма ФАО, их связи с внешними условиями и внутриклеточным составом клеток были проведены главным образом с использованием лабораторных культур, обогащенных “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” [22, 83].

Выполненный в соответствии с основной моделью ФАО расчет показывает, что в анаэробной фазе при потреблении ацетата отношение Р/С зависит от кислотности среды, увеличиваясь от 0.2



до 0.75 моль Р/моль С при возрастании рН от 5.5 до 8.5. При нейтральной реакции среды Р/С составляет около 0.5 [84]. Многочисленные экспериментальные данные, полученные с использованием обогащенных “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” лабораторных культур и удаляющих фосфор активных илов полномасштабных очистных сооружений, как правило, подтверждают расчет: величины Р/С в большинстве случаев находятся в пределах 0.25–0.75 моль Р/моль С [21, 83, 84]. Вместе с тем, соотношение Р/С во многом определяется физиологическим состоянием культуры, в частности, количеством запасенных в аэробный период полифосфатов [22]. Для *Tetrasphaera* при использовании глицина Р/С составило 0.48 моль Р/моль С [67], а для *Micrococcus phosphovor* при росте на смешанном органическом субстрате – 0.39 моль Р/моль С [85].

Отношение (суммарный удаленный из раствора фосфор)/(поглощенное органическое вещество) – показатель чрезвычайно вариабельный. В соответствии с основной моделью ФАО, для включения 1 мг фосфора в полифосфат необходимо потребление около 24 мг ацетата [86]. Экспериментальные данные показывают, что этот показатель изменяется в широких пределах от 8 до 25 мг в зависимости от условий проведения эксперимента или используемой технологии биологического удаления фосфора [20, 21]. В технологической практике принимают, что при удалении 1 мг фосфора расходуется 7–10 мг легкодоступного органического вещества (ацетата) [87], а для надежного удаления фосфора органического вещества требуется около 20 мг [14].

**Влияние внешних факторов на ФАО.** Существование ФАО в консорциуме микроорганизмов активного ила и успешность биологического удаления фосфора на очистных сооружениях определяется многими факторами: наличием и природой легкодоступных источников углерода и энергии, природой акцепторов электронов, режимом циклов, температурой, кислотностью среды, наличием необходимых микроэлементов и т.д.

Одной из основных причин падения эффективности биологического удаления фосфора считается неблагоприятный для ФАО исход конкуренции за органическое вещество с гликоген-аккумулирующими организмами (ГАО). ГАО – физиологическая группа аэробных микроорганизмов, способных к существованию в циклических условиях, сходных с ФАО. ГАО поглощают и накапливают внутри клеток органический субстрат в анаэробных условиях, а затем используют его для синтеза биомассы и получения энергии в аэробных условиях [88, 89]. В первом приближении биохимические модели ФАО и ГАО близки, однако у ГАО отсутствует цикл “фосфаты–полифосфаты”, т.е. при развитии ГАО наблюдается снижение в ак-

тивном иле доли ФАО и падение эффективности удаления фосфора. Считается, что исход конкуренции ФАО – ГАО определяется температурой, соотношением в среде органического вещества к фосфатам (доступностью фосфора), типом органического субстрата и кислотностью среды [89].

*Зависимость от температуры.* Для ФАО оптимальной, как правило, оказывается температура около 20°C, однако достаточно высокая активность наблюдается даже при 5°C [90, 91]. Со снижением температуры с 20 до 5°C эффективность биологического удаления фосфора после кратковременного падения может даже возрастать, превышая в несколько раз величины, характерные для условий при 20°C [92]. По этой причине некоторые авторы относят ФАО к психрофильным микроорганизмам или к мезофилам, пограничным с психрофилами [93, 94]. Повышение температуры культивирования до 30–35°C ведет к снижению тотальной активности ФАО [93].

Считается, что от температуры зависит итог может исход конкуренции в активном иле между ФАО и ГАО, а при температуре 20°C и ниже конкурентное преимущество получают ФАО. Например, при понижении температуры культивирования с 20 до 10°C в циклической культуре, обогащенной ГАО, наблюдалось постепенное вытеснение ГАО представителями ФАО [96]. Наоборот, при повышении температуры ФАО вытесняются из системы мезофильными ГАО. Основанием для такого вывода служат факты увеличения доли ГАО при температурах выше 20°C, а также зависимость от температуры скоростей выделения фосфатов и потребления ацетата в анаэробных условиях [96, 97].

Вместе с тем, имеются сообщения о стабильном и эффективном процессе удаления фосфора (в результате метаболизма ФАО) и при температурах 28–30°C, характерных для очистных сооружений в тропическом климате [98–102]. В работе Онга с соавт. [103] показано устойчивое удаление фосфора при повышении температуры с 24 до 32°C. Авторы предполагают, что “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” тип ПФ обладает высокой устойчивостью к воздействию тепла, что и позволяет вести процесс удаления фосфора даже при 32°C. В другой работе этого коллектива [98] показано, что достаточно высокая эффективность удаления фосфора и повышенное соотношение ФАО/ГАО сохраняется при температуре 28°C: бактерии группы ФАО “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” и ГАО составили соответственно 36 и 7%. Стабильное удаление фосфора при высоких температурах удалось получить и при использовании “стратегии мультицикла” – многократном чередовании условий аэробноанаэробноанаэробноанаэробноанаэробно в ходе одного цикла удаления фосфора [104].

*Способность к денитрификации и влияние нитритов.* Оценка способности к использованию нитратов или нитритов в качестве акцепторов электронов денитрифицирующими ФАО (ДФАО) – важнейшее научно-практическое направление исследований, связанное с экономическими преимуществами использования денитрификации в технологиях очистки сточных вод от биогенных элементов. По сравнению с процессами удаления фосфора и азота, осуществляемыми разными группами организмов (ФАО плюс “обычные” денитрифицирующие микроорганизмы), использование ДФАО приводит к тем же результатам, но с меньшим потреблением кислорода и с меньшим приростом биомассы [105]. Соответственно, в промышленных биореакторах могут быть снижены энергозатраты на принудительную аэрацию и расходы, связанные с обработкой образующегося осадка. Кроме того, ДФАО на удаление Р и азота используют меньше легкодоступного органического вещества, находящегося в муниципальной сточной воде в дефиците, и зачастую ограничивающего глубину удаления этих элементов [106]. Кроме того, способность к денитрификации – один из возможных факторов, определяющих исход конкуренции между ФАО и ГАО.

Существование способных к денитрификации, по крайней мере некоторых представителей ФАО, не вызывает сомнений, так как одновременное удаление Р и денитрификация в близких к бескислородным условиях наблюдалось как в лабораторных установках, так и на полномасштабных сооружениях [107, 108]. Однако организмы, участвующие в этих процессах, до сих пор детально не изучены. Ланхем с соавт. [107] отмечают, что в отношении “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” доминируют две гипотезы: 1) существуют несколько фенотипов: неспособные к денитрификации ФАО, нитрит-восстанавливающие ДФАО (в основном связанные с “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” тип II) и нитрат-восстанавливающие ДФАО (связанные с “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” тип I) [109, 110]; 2) существует только один фенотип – нитрит-восстанавливающие ДФАО, а превращение нитрата в нитрит в микробном консорциуме активного ила осуществляется сопутствующими популяциями [111, 112]. Что касается относящихся к ФАО представителей *Tetrasphaera*, то их поглощение Р при денитрификации оказалось очень низким [113].

Несмотря на способность использовать нитриты в качестве акцептора электронов, при высоких концентрациях нитрита наблюдается ингибирование метаболических процессов ФАО [114–116]. В настоящее время установлено, что ингибирующее воздействие оказывает не столько нитрит, сколько свободная азотистая кислота, подавляющая метаболическую активность ФАО как в аэробный (или

аноксидный), так и в анаэробный период. Показано [117], что в аэробной фазе уже в диапазоне концентраций 0.36–0.52 мкг N-HNO<sub>2</sub>/л происходит 50%-ное снижение скорости поглощения ФАО ортофосфатов, образования гликогена и скорости роста, причем ингибирующий эффект проявляется сильнее в процессах анаболизма, чем в катаболических реакциях (окислении полигидроксиалканатов). При концентрациях 2–10 мкг N-HNO<sub>2</sub>/л происходило полное ингибирование этих процессов [117, 118].

В условиях денитрификации поглощение фосфатов ингибировалось азотистой кислотой при концентрациях менее 2 мкг N-HNO<sub>2</sub>/л, а при концентрации 20 мкг N-HNO<sub>2</sub>/л – полностью подавлялось [119]. При содержании 44 мкг N-HNO<sub>2</sub>/л наблюдалось “переключение” денитрифицирующей ФАО на анаэробный метаболизм (выброс фосфатов и распад гликогена), несмотря на присутствие нитратов как акцептора электронов [120]. Показано, что в анаэробном периоде скорость поглощения органического вещества падала вдвое при концентрациях азотистой кислоты 1–2 мкг N-HNO<sub>2</sub>/л [121].

*Влияние фосфатов.* В работах Уэллса с соавт. [122] установлено, что концентрация фосфатов оказывала существенное влияние на структуру и обилие микробного сообщества ФАО, а при лимите по фосфору доминирует “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” тип II. Эти результаты подтверждены японскими исследователями [123], установившими, что избыточная концентрация фосфатов ингибирует активность ФАО, причем ингибирующий эффект более выражен у представителей “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” типа II, чем у типа I. В условиях лимита по фосфору, при концентрациях менее 5 мг Р/л, среди представителей “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” доминирует тип II, тогда как при концентрациях 50–500 мг Р/л преимущество получают представители типа I. Для описания зависимости скорости роста ФАО от концентрации фосфора фосфатов авторы используют модифицированную кинетическую модель Михаэлиса–Ментен с учетом ингибирования:

$$V = V_{\max} s / [(K_m + s)(1 + s/K_i)],$$

где  $V$  и  $V_{\max}$  – актуальная и максимальная удельные скорости потребления субстрата,  $s$  – концентрация субстрата.  $K_m$  и  $K_i$  – константы полунасыщения и ингибирования соответственно, численные значения которых приведены в табл. 1.

Следует отметить, что концентрация фосфора фосфатов в сточных водах, как правило, находится в пределах 1–10 мг Р-РО<sub>4</sub>/л, когда ингибирующий эффект не проявляется, при этом выражен положительный эффект фосфатов на активность и скорость роста ФАО.

**Биотехнологические аспекты биологического удаления фосфора.** Создание циклических условий, необходимых для успешного развития ФАО и проведения биологического удаления фосфора, в полной мере осуществляется при циклическом культивировании микроорганизмов [124]. Этот тип культивирования основан на последовательной смене нескольких фаз выращивания с отличающимися друг от друга условиями роста и продолжительностью цикла, сопоставимым (меньшим) с продолжительностью цикла клеточного деления (удвоения биомассы). Прохождение фаз роста в определенной последовательности обеспечивает конкурентоспособность ФАО и осуществление биологического удаления фосфора. Циклически меняющимися факторами могут быть любые физико-химические параметры – температура, концентрация кислорода, содержание и состав органического вещества и т.п. В случае ФАО, такими параметрами служат концентрация акцепторов электронов (кислорода, нитратов, нитритов) и легкодоступных органических веществ, а продолжительность цикла устанавливается меньше, чем время удвоения биомассы [26]. Циклическое культивирование может включать элементы и непрерывного, и периодического культивирования, чередующиеся на протяжении одного цикла выращивания в определенном порядке.

Создание циклических условий для развития обогащенного ФАО активного ила и осуществления процесса удаления фосфора связано, главным образом, с использованием циклических реакторов типа SBR (Sequencing Batch Reactor – последовательный периодический реактор; синонимы: последовательно-циклический реактор, реактор последовательно периодического действия, реактор последовательно-переменного действия, реактор циклического действия), а также с организацией внутренних реактивов в проточных биореакторах [125].

На небольших и среднего масштаба сооружениях биологическая очистка сточных вод от фосфора, а также лабораторные исследования проводятся, как правило, в реакторах типа SBR [126, 127], позволяющих в одной емкости за один цикл культивирования провести культуру ФАО или активный ил через серию фаз, составляющих единый цикл очистки сточной воды. Как и в случае с обычным периодическим культивированием, цикл очистки воды в SBR начинается заполнением реактора исходной средой (сточной водой), и заканчивается удалением отработанной среды (рис. 4).

После подачи сточной воды в биореактор, частично заполненный уплотненным активным илом (1), иловая смесь инкубируется в анаэробных условиях (2), где происходит гидролиз поли-

**Таблица 1.** Ориентировочные кинетические константы “*Ca. Accumulibacter phosphatis*”

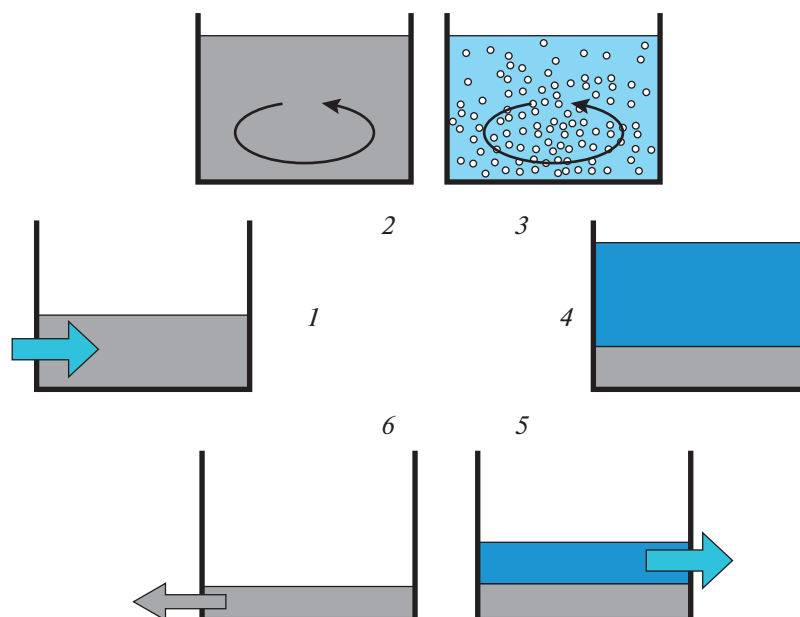
“ <i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> ”	$K_m$ , мг Р/л	$K_i$ , мг Р/л
Тип I	0.48	2000
Тип II	0.5	300

фосфатов с выходом фосфатов из клеток ФАО и потребление содержащегося в поступающей сточной воде легкодоступного органического вещества. В следующей фазе (3) иловую смесь аэрируют, ФАО окисляют запасенное органическое вещество и поглощают фосфаты с образованием полифосфатов. Затем следует период отстаивания (5) и удаления из биореактора очищенной сточной воды. Часть обогащенного полифосфатами активного ила выводится из системы (т.н. избыточно-активного ила). После этого цикл очистки повторяется. При жестком соблюдении условий существования ФАО, степень обогащения активного ила этими микроорганизмами в таких установках может достигать 90–99% (например, в работе [128]).

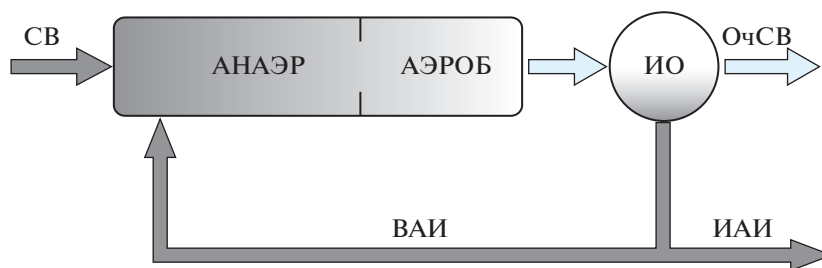
Следует отметить, что рабочие циклы в SBR могут отличаться от представленного варианта. Например, при использовании для отделения ила мембранных систем отсутствует период отстаивания. Добавление поступающей сточной воды может не выделяться в отдельную фазу, а происходить параллельно с протеканием других фаз, вплоть до варианта непрерывной подачи сточной воды в течение всего цикла SBR. В некоторых технологиях аэробная фаза может быть заменена на аноксидную (с наличием нитратов или нитритов), или аноксидная и аэробная фазы могут следовать друг за другом [129, 130].

При биологическом удалении фосфора в промышленных масштабах широко используются биореакторы проточного типа, конфигурация и организация потоков в которых позволяет последовательно проводить активный ил через анаэробные и аэробные (или аноксидные) зоны соответственно богатые и обедненные легкодоступным органическим веществом [131]. В таких системах происходит развитие консорциума микроорганизмов, обогащенных ФАО, и их активность поддерживается на уровне, достаточном для удаления фосфатов из муниципальных сточных вод. В исходной сточной воде содержится, как правило, 5–10 мг/л фосфора, тогда как после биологической очистки его концентрация снижается до 0.1–1.0 мг/л [132].

Для создания циклической смены условий для удаления фосфора в проточных биореакторах организуют зоны, обедненные или обогащенные кислородом и органическим веще-



**Рис. 4.** Вариант биологического удаления фосфора из сточных вод в биореакторе типа SBR. 1 – подача в биореактор с активным илом сточной воды; 2 – анаэробная фаза; 3 – аэробная фаза; 4 – отстаивание; 5 – удаление очищенной сточной воды; 6 – удаление приросшего (избыточного) активного ила, обогащенного полифосфатами.



**Рис. 5.** Схема процесса Phoredox. СВ – сточная вода; АНАЭР – анаэробная зона биореактора; АЭРОБ – аэробная зона биореактора; ИО – отделитель ила; ОчСВ – очищенная сточная вода; ВАИ – возвратный активный ил; ИАИ – избыточный активный ил.

ством путем регулирования интенсивности аэрации и перемешивания, а также созданием рециклов – возврата части потока сточной воды и (или) иловой смеси из одной зоны биореактора в другую.

Первый простейший непрерывный процесс для биологического удаления фосфора из сточной воды Phoredox (Phosphorus REDuction OXidation) был разработан еще в 70 гг. (рис. 5) [133]. Цикличность условий для развития ФАО реализуется в результате прохождения иловой смеси через две последовательно расположенные зоны. В первой, анаэробной (без аэрации) происходит смешивание возвратного активного ила и сточной воды. Вместе со сточной водой поступают легкодоступные органические вещества, а отсутствие или крайне низкие концентрации  $O_2$  созда-

ют условия для их ферментации с образованием летучих жирных кислот. В этой зоне ФАО потребляют органическое вещество и выбрасывают в среду фосфаты.

Затем иловая смесь поступает в аэробную зону, обогащающуюся кислородом принудительной аэрацией. В этой зоне ФАО поглощают фосфаты, а затем ил поступает в илоотделитель. После отделения ила часть обогащенного фосфором активного ила (избыточный активный ил или прирост активного ила) выводится из процесса, а остальная часть возвращается в анаэробную зону, и цикл удаления фосфора повторяется. Длительность пребывания в зонах и концентрация активного ила подбираются таким образом, чтобы концентрация фосфора на выходе из аэробной зоны

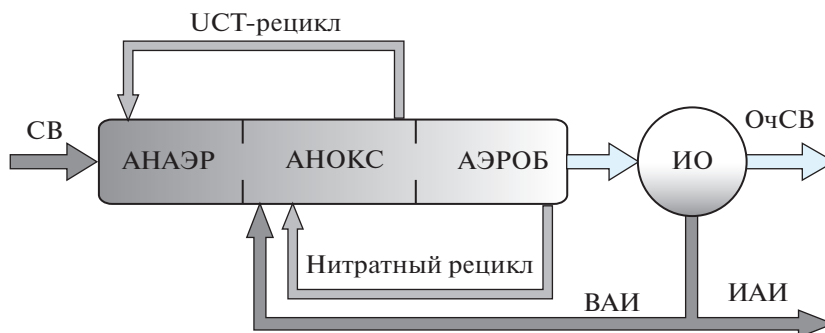


Рис. 6. Схема UST-процесса. АНОКС – аноксидная зона биореактора. Остальные обозначения, как на рис. 5.

была ниже, чем в поступающей воде и соответствовала проектному значению.

Процесс Phoredox предназначен для очистки сточных вод от органического вещества и фосфора, однако в настоящее время к очистным сооружениям предъявляются требования очистки не только от этих загрязнителей, но и от азота. Поэтому широко используются более сложные технологические схемы. Одна из наиболее распространенных технологий была разработана в Кейптаунском университете и носит название “UST – процесс” (University of Cape Town) [134].

В UST-процессе (рис. 6) органическое вещество удаляется окислением сначала в аноксидной зоне (в ходе денитрификации), а затем в аэробной зоне. Азот удаляется в молекулярном виде путем последовательной нитрификации (в аэробной зоне) – денитрификации (в аноксидной зоне). Для этой цели организован нитратный рецикл, возвращающий часть образующихся в аэробной зоне нитратов в аноксидную зону. Путем организации UST-рецикла исключается попадание большей части нитратов из аноксидной зоны в анаэробную, в которой начинается первый этап цикла удаления фосфора. Поглощение фосфатов происходит последовательно в аноксидной зоне денитрифицирующими ФАО, а затем – в аэробной зоне.

**Ближайшие перспективы.** Полученные в последние годы результаты исследований физиологии и экологии ФАО привели к появлению новых биотехнологических решений, существенно отличающихся от перечисленных нами “классических” вариантов циклических процессов удаления фосфора.

Так, в работах Ванга с соавт. было показано, что циклы потребления-выделения фосфатов могут быть вызваны не только циклическими изменениями наличия/отсутствия акцепторов электронов [135–137]. Фосфатный цикл возможен в перманентно аэробных условиях, но при чередовании (1) периодов высокого содержания легкодоступного органического источника углерода и энергии вещества с периодами (2) длительного

голодания. В период (1) происходит потребление субстрата и синтез полифосфатов, в период (2) – выброс фосфатов. Авторы предложили свою модель обнаруженного явления [138]. При наличии в среде в аэробный период глюкозы или ацетата (период 1) происходит их быстрое потребление и синтез ПГА и гликогена, а затем – окисление накопленных внутриклеточных биополимеров и потребление фосфатов с синтезом полифосфатов. В период длительного голодания (период 2) источником энергии для поддержания жизнеспособности служат полифосфаты, гидролиз которых приводит к выбросу фосфатов.

Разработан и исследован новый процесс, сочетающий циклы удаления фосфора, окисления/восстановления серы и денитрификацию и получивший название “Глубокое биологическое удаление фосфора, связанное с денитрификационным превращением серы” (Denitrifying Sulfur conversion-associated Enhanced Biological Phosphorus Removal, DS-EBPR) [139]. Процесс основан на взаимодействии сульфат-редуцирующих микроорганизмов и ФАО, способных к окислению сульфидов нитратом, проводится чередованием анаэробных/аноксидных условий, не нуждается в кислороде и заметно снижает выход биомассы по субстрату.

Ведутся работы и в направлении оптимизации традиционной схемы удаления фосфора за счет повышения разнообразия симбиотических отношений внутри консорциума активного ила. Например, появились обнадеживающие результаты использования в качестве источника кислорода фотосинтетических микроорганизмов, заменяющих принудительную аэрацию и, тем самым, существенно повышающих экономическую привлекательность такой технологии [140].

Одно из перспективных направлений разработки новых подходов по биологическому удалению фосфора из сточных вод связано с достижениями в области синтетической биологии и метаболической инженерии микроорганизмов. Учитывая, что выделить ФАО в чистые культуры

до настоящего времени не удается, одним из способов повышения эффективности удаления фосфора является использование генно-инженерных штаммов бактерий других видов, способных эффективно поглощать фосфаты из среды. Например, был получен штамм *Pseudomonas aeruginosa* с инактивируемым геном *phoU* [141]. В другой работе получили рекомбинантный штамм магнитотактической бактерии *Magnetospirillum gryphiswaldense*, в которой был дополнительно экспрессирован ген полифосфат-киназы (*ppk*) [142]. В результате этих модификаций полученные генно-инженерным способом бактерии стали более эффективно аккумулировать полифосфаты из окружающей среды. Использование таких микроорганизмов является перспективным направлением разработки новых эффективных биотехнологических подходов для удаления фосфатов из сточных вод.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-25016 мк) и министерства образования и науки РФ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farley M. Eutrophication in Fresh Waters: an International Review // Encyclopedia of Lakes and Reservoirs / Eds. Bengtsson L., Herschy R.W., N.Y.: Fairbridge Springer-Verlag Inc., 2012. P. 258–270.
2. Cordell D., White S. // Agronomy. 2013. V. 3. P. 86–116. <https://doi.org/10.3390/agronomy3010086>
3. Cornel P., Schaum C. // Water SciюTechnolю. 2009. V. 59. № 6. P. 1069–1076.
4. Phosphorus and Nitrogen Removal From Municipal Wastewater Principles and Practices. 2nd Ed. / Ed. R.I. Sedlak. CRC Press. Taylor & Frances Group, 1991. 256 p.
5. Bunce J.T., Ndam E., Ofiteru I.D., Moore A., Graham D.W. // Front. Environ. Sci. 2018. V. 6. Article 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00008>
6. Hirota R., Kuroda A., Kato J., Ohtake H. // J. Biosci. Bioeng. 2010. V. 109. № 5 P. 423–432.
7. Wilfert P., Kumar P.S., Korving L., Witkamp G.-J., van Loosdrecht M.C.M. // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 49. № 16. P. 9400–9414.
8. Srinath E.G., Sastry C.A. and Pillai S.C. // Experientia. 1959. V. 15. № 9. P. 339–340.
9. Shapiro J., Levin G.V., Zea H.G. // J. Water Pollut. Control Fed. 1967. V. 39. № 11. P. 1811–1818.
10. Shapiro J. // Science. 1967. V. 155. P. 1269–1271.
11. Barnard J.L. // Water Wastes Eng. 1974. V. 11. № 7. P. 33–36.
12. Barnard J.L. // Water Res. 1975. V. 9. № 5–6. P. 485–490.
13. Nicholls H.A. // Water SA. 1975. V. 1. № 3. P. 121–132.
14. Janssen P.M.J., Meinema K., van der Roes H.F. Biological phosphorus removal: manual for design and operation. London: Stowa. 2002. 224 p.
15. Wentzel M.C., Comeau Y., Ekama G.A., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Enhanced Biological Nutrient Removal // Biological Wastewater Treatment Principles, Modelling and Design / Eds. Henze M., van Loosdrecht M.C.M., Ekama G.A., Brdjanovic D. London: IWA Pub., 2008. P. 155–220.
16. Levin G.V., Shapiro J. // J. Water Pollut. Control Fed. 1965. V. 37. № 6. P. 800–821.
17. Fuhs G.W., Chen M. // Microbiol. Ecol. 1975. V. 2. № 2. P. 119–138.
18. Kulaev I.S., Vagabov V.M., Kulakovskaya T.V. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd. 2004. 273 p.
19. Rehm B.H.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. № 8. P. 578–592.
20. Wentzel M.C., Loewenthal R.E., Ekama G.A., Marais G.V.R. // Water S.A. 1988. V. 14. № 2. P. 81–92.
21. Schuler A.J., Jenkins D. // Water Environ. Res. 2003. V. 75. № 6. P. 485–498.
22. Welles L., Abbas B., Sorokin D.Y., Lopez-Vazquez C.M., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. 2121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02121>
23. Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Heijnen J.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. № 2. P. 289–296.
24. Mino T., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. // Wat. Res. 1998. V. 32. № 11. P. 3193–3207.
25. Seviour R.J., Mino T., Onuki M. // FEMS Microbiol. Rev. 2003. V. 27. № 1. P. 99–127.
26. Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов Н.В. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 4. С. 401–416.
27. Mino T., Arun V., Tsuzuki Y., Matsuo T. Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal // Biological phosphate removal from wastewaters / Ed. Ramadori R. Oxford: Pergamon Press. 1987. P. 27–38.
28. Arun V., Mino T., Matsuo T. // Water Res. 1988. V. 22. № 5. P. 565–570.
29. Comeau Y., Hall K.J., Hancock R.E.W., Oldham W.K. // Water Res. 1986. V. 20, № 12. P. 1511–1521.
30. Wentzel M.C., Lotter L.H., Loewenthal R.E., Marais G.V.R. // Water S.A. 1986. V. 12. № 4. P. 209–224.
31. Hesselmann R.P.X., Von Rummell R., Resnick S.M., Hany R., Zehnder J.B. // Water Res. 2000. V. 34. № 14. P. 3487–3494.
32. Pijuan M., Oehmen A., Baeza J.A., Casas C., Yuan Z. // Biotechnol. Bioeng. 2008. V. 99. № 1. P. 170–179.
33. Hesselmann R.P.X., Werlen C., Hahn D., van der Meer J.R., Zehnder A.J.B. // Syst. Appl. Microbiol. 1999. V. 22. P. 454–465.
34. Bond P.L., Hugenholtz P., Keller J., Blackall L.L. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 5. P. 1910–1916.
35. Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D., Blackall L.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 3. P. 1175–1182.

36. Zilles J.L., Peccia J., Kim M., Hung C., Noguera D.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 6. P. 2763–2769.
37. Zilles J.L., Hung C.H., Noguera D.R. // *Water Sci. Technol.* 2002. V. 46. № 1–2. P. 123–128.
38. Kong Y.H., Nielsen J.L., Nielsen P.H. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. № 9. P. 5383–5390.
39. He S., Gu A.Z., McMahon K.D. // *Microb. Ecol.* 2008. V. 55. № 2. P. 229–236.
40. Lu H., Oehmen A., Viridis B., Keller J., Yuan Z. // *Water Res.* 2006. V. 40. № 20. P. 3838–3848.
41. Peterson S.B., Warnecke F., Madejska J., McMahon K.D., Hugenholtz P. // *Environ. Microbiol.* 2008. V. 10. № 10. P. 2692–2703.
42. McMahon K.D., Dojka M.A., Pace N.R., Jenkins D., Keasling J.D. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 10. P. 4971–4978.
43. He S., Gall D.L., McMahon K.D. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. № 18. P. 5865–5874.
44. Kim J.M., Lee H.J., Kim S.Y., Song J.J., Park W., Jeon C.O. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 12. P. 3825–3835.
45. Mao Y., Graham D.W., Tamaki H., Zhang T. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 11857. <https://www.nature.com/articles/srep11857>
46. Martín G.H., Ivanova N., Kunin V., Warnecke F., Barry K.W., McHardy A.C., Yeates C., He S., Salamov A.A., Szeto E., Dalin E., Putnam N.H., Shapiro H.J., Pangilinan J.L., Rigoutsos I., Kyrpides N.C., Blackall L.L., McMahon K.D., Hugenholtz P. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 10. P. 1263–1269.
47. Mino T., Satoh H. // *Nature Biotechnology.* 2006. V. 24. № 10. P. 1229–1230.
48. He S., McMahon K.D. // *Microb. Biotechnol.* 2011. V. 4. № 5. P. 603–619.
49. Flowers J.J., He S., Malfatti S., del Rio T.G., Tringe S.G., Hugenholtz P., McMahon K.D. // *The ISME Journal.* 2013. V. 7. № 12. P. 2301–2314.
50. Wexler M., Richardson D.J., Bond P.L. // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. № 12. P. 3029–3044.
51. Skennerton C.T., Barr J.J., Slater F.R., Bond P.L., Tyson G.W. // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. № 5. P. 1574–1585.
52. Wilmes P., Andersson A.F., Lefsrud M.G., Wexler M., Shah M., Zhang B., Hettich R.L., Bond P.L., VerBerkmoes N.C., Banfield J.F. // *ISME J.* 2008. V. 2. P. 853–864.
53. Oyserman B.O., Noguera D.R., del Rio T.G., Tringe S.G., McMahon K.D. // *ISME J.* 2016. V. 10. № 4. P. 810–822.
54. Wong M.T., Mino T., Seviour R.J., Onuki M., Liu W.-T. // *Water Res.* 2005. V. 39. № 13. P. 2901–2914.
55. Beer M., Stratton H.M., Griffiths P.C., Seviour R.J. // *J. Appl. Microbiol.* 2006. V. 100. № 1. P. 223–243.
56. Nguyen H.T., Nielsen J.L., Nielsen P.H. // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. № 10. P. 2826–2837.
57. Tarayre C., Nguyen H.-T., Brognaux A., Delepierre A., De Clercq L., Charlier R., Michels E., Meers E., Delvigne F. // *Sensors.* 2016. V. 16. P. 1–14.
58. Stokholm-Bjerregaard M., McIlroy S.J., Nierychlo M., Karst S.M., Albertsen M., Nielsen P.H. A // *Front Microbiol.* 2017. V. 8:718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00718>
59. Tarayre C., Charlier R., Delepierre A., Brognaux A., Bauwens J., Francis F., Dermience M., Lognay G., Taminiau B., Daube G., Compère P., Meers E., Michels E., Delvigne F. // *Environmental Science and Pollution Research.* 2017. V. 24. № 9. P. 8017–8032.
60. Maszenan A.M., Seviour R.J., Patel B.K.C., Schumann P., Burghardt J., Tokiwa Y., Stratton H.M. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. № 2. P. 593–603.
61. Kong Y., Nielsen J.L., Nielsen P.H. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 7. P. 4076–4085.
62. Nguyen H.T., Le V.Q., Hansen A.A., Nielsen J.L., Nielsen P.H. // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011. V. 76. № 2. P. 256–267.
63. Muszynski A., Zaleska-Radziwill M. // *Architecture Civil Engineering Environment.* 2015. V. 8. № 4. P. 99–105.
64. Kong Y., Xia Y., Nielsen P.H. // *Environ. Microbiol.* 2008. V. 10. № 8. P. 2008–2019.
65. Nielsen J.L., Nguyen H., Meyer R.L., Nielsen P.H. // *Microbiology.* 2012. V. 158. P. 1818–1825.
66. Kristiansen R., Nguyen H.T.T., Saunders A.M., Nielsen J.L., Wimmer R., Le V.Q., McIlroy S.J., Petrovski S., Seviour R.J., Calteau A., Nielsen K.L., Nielsen P.H. // *ISME J.* 2013. V. 7. P. 543–554.
67. Nguyen H.T., Kristiansen R., Vestergaard M., Wimmer R., Nielsen P.H. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 14. P. 4809–4818.
68. Hanada S., Liu W.T., Shintani T., Kamagata Y., Nakamura K. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 883–887.
69. Onda S., Takii S. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2002. V. 48. P. 125–133.
70. McKenzie C.M., Seviour E.M., Schumann P., Maszenan A.M., Liu J.-R., Webb R.I., Monis P., Saint C.P., Steiner U., Seviour R.J. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 2279–2290.
71. Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K., Kamagata Y. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995. V. 45. P. 17–22.
72. Kawakoshi A., Nakazawa H., Fukada J., Sasagawa M., Katano Y., Nakamura S., Hosoyama A., Sasaki H., Ichikawa N., Hanada S., Kamagata Y., Nakamura K., Yamazaki S., Fujita N. // *DNA Res.* 2012. V. 19. № 5. P. 383–394.
73. Nakamura K., Masuda K., Mikami E. // *J. Ferment. Bioeng.* 1991. V. 4. P. 258–263.
74. Marques R., Santos J., Nguyen H., Carvalho G., Noronha J.P., Nielsen P.H., Reis M.A.M., Oehmen A. // *Water Res.* 2017. V. 122. P. 159–171.

75. Chernousova E., Gridneva E., Grabovich M., Dubinina G., Akimov V., Rossetti S., Kuever J. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. № 12. P. 3128–3135.
76. Rubio–Rincón F.J., Welles L., Lopez–Vazquez C.M., Nierychlo M., Abbas B., Geleijnse M., Nielsen P.H., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. // *Water Res.* 2017. V. 116. P. 53–64.
77. Kong Y., Xia Y., Nielsen J.L., Nielsen P.H. // *Microbiology.* 2007. V. 153. № 12. P. 4061–4073.
78. Terashima M., Yama A., Sato M., Yumoto I., Kamagata Y., Kato S. // *Microbes Environ.* 2016. V. 31. № 4. P. 449–455.
79. Zhang H., Sekiguchi Y., Hanada S., Hugenholtz P., Kim H., Kamagata Y., Nakamura K. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. 1155–1163.
80. Spring S., Wagner M., Schumann P., Kämpfer P. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. 621–629.
81. Sun L., Zhao X., Zhang H., Zhang Y. // *Ecological Engineering.* 2015. V. 81. P. 82–88.
82. Soo R.M., Skennerton C.T., Sekiguchi Y., Imelfort M., Paech S.J., Dennis P.G., Steen J.A., Parks D.H., Tyson G.W., Hugenholtz P. // *Genome Biol. Evol.* 2014. V. 6. P. 1031–1045.
83. Welles L., Tian W.D., Saad S., Abbas B., Lopez–Vazquez C.M., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. // *Water Res.* 2015. V. 83. P. 354–366.
84. Smolders G.J.F., Van der Meij J., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J. J. // *Biotechnol. Bioeng.* 1994. V. 43. № 6. P. 461–470.
85. Nakamura K., Ishikawa S., Kawaharasaki M. // *J. Ferment. Bioeng.* 1995. V. 80. P. 377–382.
86. Smolders G.J.F., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 1994. V. 44. № 7. P. 837–848.
87. Henze M., Harremoës P., Jansen J.C., Arvin E. *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg 1997. 383 p.
88. Mino T., Liu W.-T., Kurisu F., and Matsuo T. // *Water Sci. Technol.* 1995. V. 31. № 2. P. 25–34.
89. McMahon K.D., He S., Oehmen A. The microbiology of phosphorus removal. *Microbial Ecology of Activated Sludge* / Eds. Seviour R., Nielsen P.H. London: IWA, 2010. Chapter 10. P. 281–319.
90. Brdjanovic D., Logemann S., Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Alaerts G.J., Heijnen J.J. // *Water Res.* 1998. V. 32. № 4. P. 1035–1048.
91. Helmer C., Kunst S. // *Water Sci. Technol.* 1998. V. 37. № 4–5. P. 531–539.
92. Erdal U.G., Erdal Z.K., Randall C.W. // *Water Sci. Technol.* 2003. V. 47. № 11. P. 1–8.
93. Panswad T., Dounghai A., Anotai J. // *Water Res.* 2003. V. 37. P. 409–415.
94. Zheng X., Sun P., Han J., Song Y., Hu Z., Fan H., Lv S. // *Process Biochemistry.* 2014. V. 49. № 12. P. 2207–2213.
95. Tian W., Lopez–Vazquez C.M., Li W., Brdjanovic D., van Loosdrecht M.C.M. // *Chemosphere.* 2013. V. 92. № 10. P. 1314–1320.
96. Brdjanovic D., van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Alaerts G.J., Heijnen J.J. // *ASCE J Environ Eng* 1997. V. 123. № 2. P. 144–154.
97. Lopez–Vazquez C.M., Song Y.I., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Moussa M.S., Gijzen H.J., van Loosdrecht M.M. // *Biotechnol Bioeng.* 2007. V. 97. № 3. P. 483–495.
98. Ong Y. H., Chua A.S.M, Huang Y.N., Ngho G.C., You S.J. // *Sustainable Environment Research.* 2016. V. 26. P. 14–19.
99. Ong Y.H., Chua A.S.M., Lee B.P., Ngho G.C. // *Water Sci. Technol.* 2013. V. 67. № 2. P. 340–346.
100. Cao Y., Kwok B.H., van Loosdrecht M.C., Daigger G.T., Png H.Y., Long W.Y., Chye C.S., Ghani Y.A. // *Water Sci. Technol.* 2017. V. 75. № 3–4. P. 741–751.
101. Law Y., Kirkegaard R.H., Cokro A.A., Liu X., Arumugam K., Xie, C., Stokholm-Bjerregaard M., Drautz-Moses D.I., Nielsen P.H., Wuertz S., Williams R.B.H. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6 Article 25719. <https://doi.org/10.1038/srep25719>
102. Qiu G., Zuniga-Montanez R., Law Y., Thi S.S., Nguyen T.Q.N., Eganathan K., Liu X., Nielsen P.H., Williams R.B.H., Wuertz S. // *Water Res.* 2019. V. 149. P. 496–510.
103. Ong Y.H., Chua A.S.M., Fukushima T., Ngho G.C., Shoji T., Michinaka A. // *Water Res.* 2014. V. 64. P. 102–112.
104. Shen N., Chen Y., Zhou Y. // *Water Res.* 2017. V. 114. P. 308–315.
105. Kuba T., Murnleitner E., vanLoosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 1996. V. 52. № 6. P. 685–695.
106. Kuba T., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. // *Water Research.* 1996. V. 30. № 7. P. 1702–1710.
107. Lanham A. B., Oehmen A., Carvalho G., Saunders A.M., Nielsen P.H., Reis M.A.M. // *Water Science & Technology.* 2018. V.78. № 12. P. 2449–2458.
108. Zou H., Wang Y. // *Environment Protection Engineering.* 2017. V. 43. № 3. P. 225–237.
109. Flowers J.J., He S., Yilmaz S., Noguera D.R., McMahon K.D. // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1. № 6. P. 583–588.
110. Lanham A.B., Moita R., Lemos P.C., Reis M.A.M. // *Water Sci. Technol.* 2011. V. 63. № 2. P. 352–359.
111. Rubio–Rincón F.J., Lopez–Vazquez C.M., Welles L., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. // *Water Res.* 2017. V. 120. P. 156–164.
112. Saad S., Welles L., Abbas B., Lopez–Vazquez C., van Loosdrecht M. Brdjanovic D. // *Water Res.* 2016. V. 105. P. 97–109.
113. Marques R., Ribera–Guardia A., Santos J., Carvalho G., Reis M.A.M., Pijuan M., Oehmen A. // *Water Res.* 2017. V. 137. P. 262–272.
114. Zeng W., Li B., Wang X., Bai X., Peng Y. // *Chemosphere.* 2016. V. 144. P. 1018–1025.
115. Meinhold J., Arnold E., Isaacs S. // *Water Res.* 1999. V. 33. P. 1871–1883.



116. Saito T., Brdjanovic D., Van Loosdrecht M.C.M. // *Water Res.* 2004. V. 38. P. 3760–3768.
117. Pijuan M., Ye L., Yuan Z. // *Water Res.* 2010. V. 44. P. 6063–6072.
118. Zhoy Y., Ganda L., Lim M., Yuan Z., Ng W.J. // *Biore-sour. Technol.* 2012. V. 116. P. 340–347.
119. Zhou Y., Pijuan M., Yuan Z. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 98. P. 903–912.
120. Zhou Y., Ganda L., Lim M., Yuan Z., Kjelleberg S., Ng W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 88. P. 359–369.
121. Ye L., Pijuan M., Yuan Z. // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 130. P. 382–389.
122. Welles L., Lopez-Vazquez C.M., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M.C.M. and Brdjanovic D. // *AMB Express.* 2016. 6:44. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0214-z>
123. Nurmiyanto A., Koderia H., Kindaichi T., Ozaki N., Aoi Y., Ohashi A. // *Microbes Environ.* 2017. V. 32. № 3. P. 260–267.
124. Dorofeev A.G., Grigor'eva N.V., Kozlov M.N., Kevbri-na M.V., Aseeva V.G., Nikolaev Yu. A. // *Microbiology (Moscow).* 2014. V. 83. № 5. P. 450–461.
125. Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. *Wastewa-ter Engineering: Treatment and Reuse.* Metcalf and Eddy, McGraw Hill, New York, USA. 2014. 2044 p.
126. Sequencing Batch Reactor Technology. Scientific & Technical Reports № 10 / Eds. Wilderer P.A., Irvine R.L., Goronszy M.C. IWA Publishing. 2001. 76 p.
127. Artan N., Orhon D. Mechanism and design of se- quencing batch reactors for nutrient removal. Scien- tific and Technical Report Series, № 19. IWA Publish- ing, London. 2005. P. 116.
128. Saad A.S., Welles L., Lopez C.M., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. // *Chemical Engineering J.* 2017. V. 326. P. 68–77.
129. Von Sperling M. *Activated Sludge and Aerobic Biofilm Reactors.* Biological Wastewater Treatment. Volume 5. London: IWA Publishing. 2007. P. 322.
130. Wang L.K., Li Y. *Sequencing Batch Reactors Hand- book of Environmental Engineering Series. Volume 8. Biological Treatment Processes /* Eds. Wang L.K., Pereira N.C., Hung Y.T., and Shammam N.K. Huma- na Press. 2009. P. 459–511.
131. Barnard J., Comeau Y. Phosphorus removal in activat- ed sludge. *Activated Sludge – 100 Years and Counting /* Eds. Jenkins D., Wanner J. IWA Publishing. 2014. P. 93–115.
132. Neethling J. B., Bakke B., Benisch M., Gu A., Stephens H., Stensel H.D., Moore R. Factors Influencing the Reli- ability of Enhanced Biological Phosphorus Removal. WERF Report 01-CTS-3. London: IWA. 2005.
133. Barnard J.L. // *Water SA.* 1976. V. 2. № 3. P. 136–144.
134. Marais G.v.R., Loewenthal R.E., Siebritz I.P. // *Water Sci. Technol.* 1983. V. 15. № 3, 4. P. 15–41.
135. Wang D.B., Li X.M., Yang Q., Zeng G.M., Liao D.X., Zhang J. // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. P. 5466–5473.
136. Chen H.B., Wang D.B., Li X.M., Yang Q., Luo K., Zeng G. Tang M., Xiong W., Yang G. // *Biochem. Eng. J.* 2014. V. 90. P. 27–35.
137. Wang D., Xu Q., Yang W., Chen Y., Li X., Liao D., Yang G., Yang Q., Zeng G. // *Biochemical Engineering Journal.* 2014. V. 87. P. 15–24.
138. Wang D., Li X., Yang Q., Zheng W., Liu Z., Liu Y., Cao J., Yue X., Shen T., Zeng G., Deng J. // *Bioresour Technol.* 2009. V. 100. P. 4005–4011.
139. Guo G., Wu D., Ekama G.A., Hao T., Mackey H.A., Chen G. // *Water Res.* 2018. V. 141. P. 9–18.
140. Oyserman B.O., Martirano J.M., Wipperfurth S., Ow- en B.R., Noguera D.R., McMahon K.D. // *Environ. Sci. Technol.* 2017. V. 51. № 6. P. 3165–3175.
141. De Almeida L.G., Ortiz J.H., Schneider R.P., Spira B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 9. P. 3006–3015.
142. Zhou Y., Lisowski W., Zhou Y., Jern N.W., Huang K., Fong E. // *Biotechnol Lett.* 2017. V. 39. № 10. P. 1509–1514. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2383-5>

## Role of Phosphate-Accumulating Bacteria in Biological Waste Water Treatment from Phosphorus

A. G. Dorofeev<sup>a,b,\*</sup>, Yu. A. Nikolaev<sup>a</sup>, A. V. Mardanov<sup>c</sup>, and N. V. Pimenov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Winogradsky Institute of Microbiology RAS, The Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>OJSC “Moswodikanal”, Moscow, 105005 Russia

<sup>c</sup>Center of Bioengineering, The Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: DorofeevAG@mail.ru

Received June 22, 2019; revised July 24, 2019; accepted August 30, 2019

The review is devoted to the microbiological aspects of the biological removal of phosphorus from waste- water. The history of the development of biotechnology and the discovery of the physiological group of phosphate-accumulating organisms (FAO) that carry out the biological removal of phosphorus by absorb-

ing phosphates and storing them in the form of intracellular polyphosphates is briefly described. FAO are characterized by a cyclic type of metabolism, which occurs when the anaerobic/aerobic conditions are cyclically changed. Under anaerobic conditions, FAO absorb and store organic compounds through the energy of degradation of intracellular polyphosphates. When anaerobic conditions change to aerobic or an alternative electron acceptor appears, FAO uptake phosphates and synthesize intracellular polyphosphates using intracellular polymeric sources of carbon and energy accumulated under anaerobic conditions. The main representatives of the FAO, their metabolic models and physiological characteristics are described. The basic principles of the implementation of biotechnology used in the practice of wastewater treatment from phosphorus and other nutrients are considered.

*Keywords:* biological phosphorus removal, phosphate-accumulating organisms, Candidatus Accumulibacter phosphatis

УДК 579.64:57.017.3:57.047:632.93

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ ЛИПОПЕПТИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

© 2020 г. И. В. Максимов<sup>1, \*</sup>, Б. П. Сингх<sup>2, \*\*</sup>, Е. А. Черепанова<sup>1</sup>,  
Г. Ф. Бурханова<sup>1</sup>, Р. М. Хайруллин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Департамент биотехнологии Университета Мизорам, Аизавл, Индия

\*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

\*\*e-mail: bhimpratap@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2019 г.

После доработки 21.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

В обзоре приводятся современные сведения о липопептидах бактерий, преимущественно продуцируемых представителями рода *Bacillus*, играющих важную роль в защите растений от болезней грибной, бактериальной и вирусной этиологии, проявляющих фунгицидные, антибиотические, антивирусные и инсектицидные свойства, а также фитоиммуно-модулирующую активность. Приведена структурная характеристика липопептидов, описаны гены, ответственные за их синтез, принципиальные методы выделения и количественного и качественного анализа антибиотиков. Указаны защитные механизмы растений, реагирующие на липопептиды и связанные с сигнальными системами, регулируемые салицилатами и жасмонатами. Обзорное сообщение обосновывает перспективность поиска штаммов среди ризосферных и эндофитных бактерий с целью создания биопрепаратов для защиты растений от комплекса вредных организмов, стимуляции роста и продуктивности культур.

**Ключевые слова:** защита растений, микроорганизмы, стимулирующие рост растений, липопептиды, патогены, системная устойчивость растений

**DOI:** 10.31857/S0555109920010134

Важнейшим условием получения высоких урожаев сельскохозяйственных культур является интегрированная защита посевов от вредителей, болезней и сорняков, включающая организационно-хозяйственные и агротехнические мероприятия, использование биологических методов и химических средств защиты растений при сочетании профилактических и истребительных мер. Основными методами защиты растений до сих пор являются химические. Однако в последнее время в ассортименте растениеводов появились генно-модифицированные сорта, созданные на базе системы геномного редактирования CRISPR-Cas, и препараты, основанные на индукции фитоиммунных реакций растений или на механизмах РНК-интерференции целевых генов вирулентности патогена или чувствительности самого растения, что позволяет в некоторых случаях отказаться от химической защиты.

Особый интерес среди новых подходов к защите растений представляют биопрепараты, содержащие живые клетки бактерий и/или их метаболиты. Анализ метаболома таких бактерий, проявляю-

щих высокий защитный эффект в отношении растений, свидетельствует о том, что многие из них синтезируют вещества пептидной природы, подавляющие рост и развитие родственных фитопатогенных видов или штаммов, или обладающие более широким спектром биоцидного действия (бактерицидное, фунгицидное, инсектицидное и противовирусное) [1]. Часть из них синтезируется на рибосомах с участием особых плазмид (бактериоциногенных факторов) [2], другие – нерибосомально, с участием специальных мультиферментных комплексов, названных нерибосомальными пептидными синтетазам (НРПС) [1, 3, 4]. Продукты синтеза НРПС – пептиды, согласно обзорной работы Фира с соавт. [1], подразделяются на 10 подклассов.

**Многообразие липопептидов бактерий рода *Bacillus*.** Среди указанных выше антибиотиков особый интерес представляют липопептиды бактерий. Благодаря особенностям строения эти соединения амфифильны и устойчивы к гидролизу пептидазами и протеазами, а также нечувствительны к окислению, действию относительно высоких

температур. Вместе с тем, их цистеиновые остатки могут окисляться до сульфидов и/или изменять структуру до характерных внутримолекулярных C—S-связей.

Молекулы известных липопептидов содержат от 4 до 16 аминокислотных остатков в L- или D-конфигурации [3]. Основываясь на химической структуре, липопептиды можно разделить на линейные и циклические. К циклическим относят липопептиды с молекулярной структурой, содержащей циклический компонент, сформированный карбоксильной группой C-конца пептидной цепи и аминокислотной группой жирной кислоты. Линейные липопептиды содержат линейно расположенные аминокислоты, соединенные друг с другом или с жирной кислотой, связанной с  $\alpha$ -аминогруппой или гидроксильным остатком. В зависимости от структуры, циклические липопептиды подразделяются на три класса: 1) сурфактины; 2) итурины (итурин А, микосубтилин и бацилломицин); 3) фенгицины (плипастантин) [1, 4].

В 1949 г. среди метаболитов, выделяемых штаммом бактерии *Bacillus (Paenibacillus) polytuxa* IAM1213, был детально описан полимиксин — циклический низкомолекулярный пептид с жирнокислотным компонентом [5]. С тех пор структура и функции липопептидов, выделяемых из разных видов рода *Bacillus*, таких, как *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis*, а также из других бактерий, актиномицетов и грибов, активно изучается [1, 3, 6, 7].

Один и тот же штамм бактерий способен синтезировать несколько антибиотиков различных классов. Так, из почв Алжира выделены антагонистические к почвенным фитопатогенам изоляты *Bacillus* spp., продуцирующие сурфактин, пумалицидин, лихенизин, курстакин и различные изоформы фенгицина [8]. Выявлена закономерность в содержании сурфактинов, фенгицинов и итуринов, 6 : 37 : 57 соответственно, выделяемых штаммами *B. subtilis* в культуральную среду [9, 10]. Определено, что не менее 8% генома эндофитного штамма *B. amyloliquefaciens* FZB42 участвует в продукции вторичных метаболитов, включая бактериоцины, липопептиды и др. [11]. У штамма *Bacillus tequilensis* 7PJ-16 обнаружены генные кластеры, ответственные за синтез липопептидов: сурфактина, фенгицина, бациллибацина и бацилина, и бактериоцинов — субтиллина, субтилозина А [12]. В геноме штамма *B. velezensis* LM2303 обнаружены до 13 кластеров, ответственных за синтез таких липопептидов, как фенгицин-6, итурин, сурфактин-а, бутирозин, плантазолицин и его гирилозванный изомер, киянимидин, бацилизин, дифицидин, бациллаен и бациллаен Б [13]. В геноме штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Fito\_F321, выделенного из здоровых тканей

винограда *Vitis vinifera* сорта Merlot at Bairrada appellation (размер генома 3856229 п. н., Картахена, Португалия), определены гены, кодирующие белки, ответственные за синтез бациллаена, диацидина, микролактина, сурфактина и фенгицина [14]. У штамма *Bacillus atrophaeus* GQJK17, выделенного из ризосферы дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum* L.), обнаружены 8 кандидатных генных кластеров, ответственных за синтез сурфактина, бациллаена, фенгицина и бациллибацина [15]. Проведение полногеномного секвенирования ряда геномов эндофитных бактерий, в частности, рода *Bacillus* spp., позволило определить расположение генетических кластеров, ответственных за синтез липопептидов. Так, у штамма бактерии *Bacillus velezensis* 9D-6 показана локализация генов бациллозин-синтетазы в зоне 174243—215661 п. н. бактериальной хромосомы, сурфактин-синтетазы — 820469—885876 п. н., а фенгицин-синтетазы — 2364456—2489567 п. н. [7].

Не менее интересен факт способности энтомопатогенных бацилл к синтезу антибиотиков, подавляющих рост и развитие фитопатогенных бактерий и грибов. Так, у энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* pv. *kurstaki* обнаружены курстакины и описана структура генов, ответственных за их синтез [16]. Выявлено, что штаммы *B. thuringiensis* pv. *kurstaki* и *B. thuringiensis* pv. *israelensis*, продуцировали до 146 и 93 мг/г клеток курстакина соответственно [17]. Кроме того, из культурального фильтрата этого вида бактерии выделен и охарактеризован циклический липопептид, по химической структуре близкий к фенгицину, проявляющий, наряду с фунгицидной и бактерицидной активностями (например, против бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis*) также и инсектицидную [18].

Эти и другие данные подтверждают многообразие классов антибиотиков и их изоформ, синтезируемых представителями ризосферных и эндофитных бактерий, и перспективность их исследований с целью поиска новых эффективных антибиотических соединений. Разнообразные свойства, обнаруженные у липопептидов, позволяют активно использовать их в различных областях. Антимикробные, фунгицидные, инсектицидные, антиканцерогенные и иммуномодулирующие свойства липопептидов могут способствовать решению проблем медицины, ветеринарии, растениеводства и формирования экологически безопасной окружающей среды.

**Особенности биосинтеза липопептидов бактериями.** Характерной особенностью бактериальных липопептидов является их нерибосомальный синтез белковыми комплексами НРПС и содержание в структуре необычных (орнитин и др.) и D-аминокислот [19, 20]. Модульная структура НРПС в точности соответствует структуре их ге-

нов, и каждый модуль является структурным блоком для ступенчатого включения аминокислоты в пептидный фрагмент липопептида [21]. Консервативные мотивы, отвечающие за стандартные процессы аденилирования и тиолирования аминокислот, чередуются с вариабельными локусами, распознающими определенный субстрат. Модули могут быть подразделены на модули инициации и удлинения. Модули инициации обычно состоят из домена аденилирования (A), ответственного за выбор и активацию аминокислот, и домена тиоляции (Tog PCP), ответственного за тиоэтерификацию активированной аминокислоты. Домены тиоэстеразы катализируют циклизацию зрелого пептида и его высвобождение [21]. Поскольку соответствующие линейные формы циклических липопептидов биологически менее активны, считается, что циклизация уменьшает конформационную свободу и обеспечивает стабилизацию соединения, которая необходима для взаимодействия с биологической мишенью.

По структуре оперона, содержащего гены НРПС, можно точно предугадать состав синтезируемого ими конечного олигопептида. Например, оперон сурфактина состоит из четырех биосинтетических генов, три из которых отвечают за пептид-синтезазу, а четвертый кодирует белок тиоэстеразу. Первый ген, *urfAA*, содержащий три модуля, включает первые три аминокислоты в пептид (глутаминовая кислота, лейцин и изолейцин). Второй ген – *urfAB*, также содержит три модуля и включает валин, аспарагиновую кислоту и лейцин. Третий ген – *urfAC*, активировывает лейцин и катализирует высвобождение и циклизацию пептидной цепи. Последний ген – *urfAD* кодирует белок, участвующий в восстановлении некорректно встроенных в структуру липопептида аминокислот во время биосинтеза пептидов [22].

За биосинтез фенгицина и плипастатина отвечает оперон *fen/pps*, содержащий пять генов, кодирующих трехмодульный фермент. Первые четыре гена (*fenA*, *fenC*, *fenD*, *fenE*) кодируют ферменты, интегрирующие аминокислоты в пептид. Пятый ген (*fenB*) кодирует белок, ответственный за включение изолейцина и, возможно, способствует закрытию кольца фенгицина [22].

Анализ профиля метаболитов бактерий рода *Bacillus* свидетельствует, что одни и те же штаммы могут одновременно продуцировать соединения, которые относятся к различным семействам липопептидов, а также и нескольких структурных аналогов одного конкретного липопептида. Например, бактерии *B. subtilis* могут продуцировать до 12 сурфактиновых аналогов, различающиеся пептидными остатками и/или их длиной и разветвлением цепи жирных кислот [23].

**Подходы к получению препаратов липопептидов.** Большинство бацилл выделяют липопептиды

в окружающую среду, что позволяет получать их в производственных масштабах, используя биотехнологические подходы. Наиболее часто используемый способ получения липопептидов в больших количествах – подбор их продуцентов среди природных или искусственно созданных штаммов или линий. Анализ штаммов *B. licheniformis*, выделенных в семи разных географических зонах, выявил различие в содержании липопептидов в зависимости от места происхождения [24]. В патенте Мелентьева с соавт. [25] в качестве продуцента сурфактина предлагается штамм *B. subtilis* ИБ-17 с выходом антибиотика до 1798 мг/л. В работе Фахима [17] приведены результаты анализа содержания липопептидов у восьми различных видов бактерий *Bacillus* spp., показавшие не только разнообразие спектра синтезируемых бактериями антибиотиков, но и выявившие их продуцентов с суммарным выходом до 2000 мг/л. Например, штамм *B. amyloliquefaciens* S499 продуцировал до 1146 мг/л сурфактина, 228 мг/л фенгицина и 614 мг/л бацилломицина, штамм *B. subtilis* ATCC 21322 – 1431 мг/л сурфактина и 360 мг/л плипастатина [17].

Другим подходом к получению продуцентов липопептидов является генетическая модификация штаммов. Так, использование геномного шаффлинга позволило Цхао с соавт. [26] создать линию бактерии *B. amyloliquefaciens* FMB72, синтезирующих в 8.3 раз больше фенгицина, чем исходный штамм *B. amyloliquefaciens* ES-2-4, выделенный из растений шлемника *S. baicalensis* Georgi. Замена промоторной части *PrepU* гена фенгицин-синтезазы на гомологичный промотор гена *Staphylococcus aureus* позволила создать штамм BMG03 с увеличенным выходом фенгицина (плипастатина) с 91 до 507 мг/л [27]. Что интересно, у этого же штамма – суперпродуцента фенгицина, увеличился и выход сурфактина (с 1023 до 1162 мг/л) [27]. Напротив, отключение экспрессии гена сурфактин-синтезазы методом геномного редактирования CRISPR-Cas9 способствовало падению уровня концентрации фенгицина в культуральном фильтрате [28]. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи между экспрессией генов, кодирующих сурфактин- и фенгицин-синтезазы.

Усилить синтез липопептидов и/или менять их количественное соотношение можно путем подбора питательных сред и условий культивирования [17, 29]. Так, продукция сурфактинов *B. subtilis* увеличивалась под влиянием присутствия в среде культивирования цитратов [30], сульфатов магния и железа [31]. Для усиления продукции бацилломицина Д штаммом *B. subtilis* *fmbJ* было предложено добавление в среду культивирования 5 г/л L-глутамина и 30 г/л инулина [32]. Особое место в получении липопептидов играют условия аэрации культуральной среды, от которой, как оказалось, зависит не только количество синтезируемого целевого липопептида, но и соотноше-

ние изомеров антибиотика [17]. Продукция итурина, фенгицина и сурфактина эндофитным штаммом *B. amyloliquefaciens* FJAT-2349 зависела от температуры культивирования и варьировала от 0.41 до 5.89 мг/л, от 4.54 до 181.67 мг/л и от 2.05 до 19.65 мг/л соответственно. Оптимальной для культивирования этого штамма, как продуцента сурфактинов, оказалась температура 20°C [33]. Вместе с тем, штамм *B. amyloliquefaciens* C2LP эффективно синтезировал итурин при 27–30°C [29]. При обработке растений томатов, фасоли и цуккини клетками *B. amyloliquefaciens* S499 отмечено эффективное влияние на продукцию сурфактинов низких положительных температур (15°C) по сравнению с высокими (30°C), коррелирующее с формированием полных биопленок и устойчивости растений к *Phytophthora infestans*, *B. cinerea* и *Podosphaera xanthii*, соответственно [34].

Обнаружена зависимость формирования биопленки и продукции липопептидов бактериями (как на уровне их накопления, так и экспрессии генов их синтез) от наличия метаболитов, выделяемых фитопатогенами или растениями, например, белковых и полисахаридных экссудатов корней [35–39]. В ризосфере наблюдали большее накопление сурфактина в сравнении с итурином и фенгицином, зависящее от набора нутриентов, от стадии колонизации ризосферы, возраста колоний [40] и температуры культивирования [34], но не всегда коррелирующее с таковой *in vitro*. Кроме того, изменения в спектре продукции липопептидов бактериями зависят и от возраста растений и фитогормонального баланса в растительных тканях. Так, бактерии, колонизирующие поверхность корней взрослых растений огурца, продуцировали больше итурина А, чем сурфактина, в сравнении с бактериями, колонизирующими эти же органы более молодых растений [40]. Ауксины, а также микроорганизмы — их продуценты, в том числе и фитопатогены способны снижать антибиотикпродуцирующую активность, например, у ризобактерии *Serratia plymuthica* A153 [37].

**Способы выявления липопептидов и определения их количественного содержания.** Определить, синтезируют ли виды и штаммы бактерий липопептиды, можно двумя способами: по конечному продукту синтеза и по наличию в геноме соответствующих генов НРПС. Для выявления способности бактерий к синтезу липопептидов часто применяется генетическое типирование бактерий методом ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на консервативные участки генов, кодирующих НРПС [41–45]. Поскольку в генах НРПС целевые последовательности неоднократно повторяются, в результате ПЦР амплифицируются полиморфные фрагменты ДНК. Виды и подвиды *Bacillus* spp. неоднородны по набору генов НРПС. Кроме того, значительное разнообразие по изомерам липопептидов предполагает

наличие в геноме бактерий различных по гомологии НРПС.

Среди генов, кодирующих НРПС, наиболее изучены семейства синтез сурфактина, фенгицина и итурина. Сурфактины известны в основном своей сурфактантной активностью, а также, как было показано, проявляют гемолитические, противовирусные и антибактериальные свойства, но имеют ограниченную противогрибковую активность. Рунгшаванг с соавт. [21] продемонстрировали, что продукт гена *sfp* имеет широкую субстратную специфичность, позволяющую осуществлять посттрансляционную модификацию как пептидолового, так и ацильного концов пептида.

Ген *B. subtilis* ZK8 (кат. NCBI — KT750873), кодирующий фосфопантетинил-трансферазу, имеет наибольшее сходство (98–100%) с гомологичными генами штаммов *B. subtilis* subsp. *krietiensis* (KC454625), *B. subtilis* (AF233756 и AB971633), *B. subtilis* 916 (FJ919233), *B. amyloliquefaciens* MH71 (KJ452562), *B. amyloliquefaciens* JT84 (KX346253), *B. amyloliquefaciens* C6a (KM886934), *B. amyloliquefaciens* Lx-11 (JN086145), *B. amyloliquefaciens* (JX684070), *Microbacterium oxydans* B2 (KP868622). С.К. Гонд с соавт. [42] показали, что эндофитные штаммы *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* продуцируют данный фермент. Ген *B. subtilis* RP24 (D21876), кодирующий итурин А-синтезазу, гомологичен (98–99%) гену фосфопантетинил-трансферазы *B. subtilis* HSN48 (MF681694), *B. subtilis* B3 (AY040867) и *B. amyloliquefaciens* JT84 (KX346253).

Итурины представлены семейством циклических липопептидов, содержащих 7 аминокислот. Его представители обладают высокой противогрибковой активностью, благодаря тому, что гидрофобные остатки молекулы встраиваются в цитоплазматическую мембрану клеток и автоматически собираются, образуя ионный канал, тем самым вызывая утечку цитоплазмы. Однако они обладают ограниченной противовирусной и антибактериальной активностью. Ген итурин В-синтезазы (JN093026) гомологичен (98–99%) с генами MG009461 *Bacillus siamensis*, EU263005 штамма *B. subtilis* MH25 и гена AY137375 *B. subtilis*, кодирующего бациломицин.

Фенгицины менее гемолитичны, чем сурфактины или итурины, и обладают сильной фунгицидной активностью. Ген AJ011849 штамма *B. subtilis* F29-3, кодирующий фенгицин-синтезазу, обладает гомологией (78–99%) с генами фенгицин-синтезазы *B. subtilis* NCD-2 (GQ906579), *B. subtilis* RMB5 (KM459608), *B. subtilis* BS6 (JN801145), *B. subtilis* NS1 (KM459605), *B. subtilis* BS2 (JN801144), *B. subtilis* BS8 (JN801143), *B. subtilis* NS2 (KM459606), *B. subtilis* S4 (KM459607), *Bacillus tequilensis* SV104 (KX099390). Фенгицин —

как продукт впервые выделен из штамма *B. subtilis* F-29-3 [46].

Кроме методов оценки наличия генов НРПС в бактериальном геноме и соответственно их экспрессионной активности, существуют биохимические и физико-химические способы выделения липопептидов и их идентификации в среде культивирования бактерий. Для этого используют следующие методы.

1. Весовой (гравиметрический) анализ, основанный на полном (количественном) выделении какого-либо компонента из анализируемого образца и последующем точном его взвешивании. Метод весового анализа устанавливает концентрацию растворов антибиотиков, применяемых для других методов количественного анализа.

2. Спектрофотометрическое измерение концентрации пептидов в растворах при длине волны 210 нм [47].

3. Колориметрические методы, когда о концентрации липопептидов судят по интенсивности поглощения света продуктами взаимодействия их с реактивом Фолина–Чокалтеу [48], либо с красителем бромтимоловым синим [49] для обнаружения липидов и фосфолипидов.

4. Метод тонкослойной хроматографии с последующим проявлением хроматограмм специфическими красителями [50].

В качестве еще одного быстрого и эффективного подхода к отбору продуцентов сурфактинов и оценки их функциональной активности предлагают использовать способность липопептидов вызывать лизис эритроцитов и образовывать мицеллы с липидами [51]. Так, сурфактин среди всех известных липопептидов характеризуется как самый сильный сурфактант, снижающий поверхностное натяжение воды от 72 до 27 мН м<sup>-1</sup> с критической концентрацией мицелл 10<sup>-5</sup> М [52]. При этом он демонстрирует и очень высокую способность к самоорганизации, образуя сферические мицеллы и более крупные агрегаты при очень низких концентрациях.

Для выделения липопептидов наиболее часто применяют их осаждение подкислением культуральной среды до pH 2 [33] с последующим перерастворением в небольшом количестве дистиллированной воды, нейтрализацией pH и добавлением метанола (до 60–80%). Следующим по частоте применения методом для получения липопептидов является метод их экстракции бутанолом, основанный на способности липопептидов растворяться в спиртах и других органических растворителях [53]. Благодаря тому, что бутанол с водой образует две фазы почти не смешивающихся жидкостей, он часто используется для экстракции липопептидов и других липид-содержащих соединений перед их анализом методом ВЭЖХ. Согласно данным литературы [54], при выделе-

нии этим способом удастся извлечь до 95% от всех секретируемых бактериями липопептидов, тогда как классическим осаждением кислотой – не более 60%. Однако при выделении из больших объемов культуральной жидкости этот метод используют редко. Для получения отдельных фракций липопептидов могут применяться различные виды жидкостной колоночной хроматографии: гель-хроматография на колонках с сефадексом LH-20, высокоэффективная жидкостная хроматография на колонках Zorbax SB-C<sub>18</sub> с применением в качестве мобильной фазы ацетонитрила и уксусной кислоты либо ее галоген-производных [42]. Для идентификации изомеров и установления их молекулярной структуры липопептиды анализируют методом масс-спектрометрии [1, 35, 42].

**Биоцидные свойства липопептидов.** Большой интерес ученых вызывает широкий спектр биоцидного (бактерицидного, фунгицидного, инсектицидного) действия липопептидов [1, 4]. Эти свойства связывают с их способностью нарушать проницаемость бактериальной цитоплазматической мембраны, формировать в ней поры и разрушать ее [1, 9]. Таксономическая избирательность и механизмы образования пор в плазмалемме различны для липопептидов разных семейств, что обуславливает их разную биологическую активность [55, 56].

Показана способность итурина и сурфактина, выделенных из штамма *B. subtilis* OG, разрушать клеточные стенки бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, вызывающих бактериозы и рак цитрусовых, соответственно [55]. С использованием линий *B. subtilis*, диких и дефицитных по продукции липопептидов, показано, что итурин, но не сурфактин и фенгицин, важный компонент антибактериальной активности [57]. С синтезом изоС<sub>15</sub>[Leu<sup>7</sup>] сурфактина связывают антибактериальные свойства эндофитного штамма *B. velezensis* 9D-6, ассоциированного с корнями растений, по отношению к *B. cereus*, *Clavibacter michiganensis*, *Pantoea agglomerans*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* и *Xanthomonas euvesicatoria*, и антигрибные по отношению к *Alternaria solani*, *Cochliobolus carbonum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gibberella pulicaris*, *Gibberella zeae*, *Monilinia fructicola*, *Pyrenochaeta terrestris* и *Rhizoctonia solani* [7]. Формируемые на поверхности корней арабидопсиса с участием сурфактина биопленки штамма *B. subtilis* 6051 ответственны за ингибирование роста патогена *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 [58]. Это было доказано с использованием мутантной линии M1 штамма *B. subtilis* 6051 с подавленным синтезом сурфактина. Близкие по структуре к сурфактинам и итуринам липопептиды были ответственны за формирование фунгицидной активности у штамма *B. subtilis* ИБ-54 – антагониста

почвенных микромицетов [25, 59]. Доказано участие сурфактина и фенгицина, но не бациллаена, синтезируемых *B. mojaviensis* [60] и *B. amyloliquefaciens* LL3 [61], в формировании биопленки и устойчивости растений, например, к грибам *A. flavus* [62] и *Fusarium graminearum* [63], кроме того, в многократном снижении уровня микотоксинов [45, 64].

Еще в конце 80-х гг. прошлого столетия было установлено, что штамм *B. subtilis* NK-330, ингибирующий рост грибов *Aspergillus flavus* и *A. parasiticus*, способен подавлять продукцию ими афлатоксина при совместной культивации на кукурузе и арахисе в условиях лаборатории, что не проявлялось в полевых условиях [65]. Особый интерес представляет то, что в деградации микотоксинов, например, гриба *A. flavus* R5, активное участие принимали бактериальные оксидоредуктазы, вовлеченные в биосинтез бацилина [45]. Оценка фунгицидных свойств изолятов *Bacillus* spp., выделенных из ризосферы кукурузы, по отношению к возбудителям фузариоза (корневых гнилей) выявила высокоэффективные штаммы, среди которых штамм NWUMFkBS10.5, идентифицированный как *B. velezensis*, продуцировал комплекс липопептидов трех классов [66]. Точно также, штаммы *B. velezensis* Y6 и F4, выделенные из почв провинции Гуанжоу (Китай), характеризующиеся как комплексные продуценты липопептидов, сдерживали развитие бактерии *R. solanacearum* и гриба *F. oxysporum* [36]. Другой, ассоциированный со злаковыми растениями, штамм *B. velezensis* LM2303, проявлял высокую фунгицидную активность против возбудителя фузариоза колоса *F. graminearum* [67]. Липопептиды эндофитного штамма *B. amyloliquefaciens* FJAT-2349 обладали биоцидной активностью в отношении возбудителя бактериального вилта томатов *R. solanacearum* FJAT-91, как в условиях *in vitro*, так и *in planta* [33].

Итурины и бацилломицины, несмотря на то, что имеют ограниченную антибактериальную активность, характеризуются биоцидной активностью в отношении широкого спектра видов грибов [15, 56, 68]. Итурин, синтезируемый штаммом *B. subtilis* KS03, *in vitro* ингибировал рост возбудителя антракноза *Gloeosporium gloeosporioides* [69]. Высокая антагонистическая активность против гриба *Pythium aphanidermatum*, как *in vitro*, так и *in vivo* обнаружена у штамма *B. subtilis* BBG100, гиперсинтезирующего микосубтилин на растениях томатов [70]. Као с соавт. [36] показали, что итурин В, продуцируемый *B. subtilis* SQR9, стимулировал устойчивость растений огурца к *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Обработка растений огурца этими бактериями значительно, на 68% в сравнении с контролем, уменьшала поражение фузариозом и способствовала росту растительной массы. Итурин в значительной степени ингибировал рост мицелия гриба *F. oxysporum* и уменьшал число проросших спор до 83.6% по

сравнению с контролем. Штамм бактерий *Bacillus* ВН072, синтезирующий итурин А, проявлял антагонизм по отношению к грибам *Aspergillus niger*, *Pythium* sp. и *Botrytis cinerea* [42]. Существенную роль итурины *B. velezensis* (Y6 и F7) играли в проявлении антифунгальной активности в отношении грибов *R. solanacearum* и *F. oxysporum* [36], а также *Valsa mali*, *F. oxysporum* и *F. verticilloides* [15]. Антифунгальную активность итуринов, синтезируемых бактериями *Bacillus*, объясняют способностью их взаимодействовать со стеринами, фосфолипидами и олеиновой кислотой мембран грибных клеток [41].

В работе [57] показано, что бацилломицин и фенгицин, выделенные из клеток штамма *B. subtilis* UMAF6614, проявили более высокую биоцидную активность против грибных и бактериальных патогенов дыни, по сравнению с сурфактином. Бацилизин, синтезируемый бактериями *B. megaterium*, приводил к образованию вздутий на кончиках растущих гиф фитопатогенных грибов *Alternaria alternate*, *Drechlera oryzae* и *F. roseum*, а продуцируемый клетками *B. pumilis* приводил к таким же эффектам у возбудителя ржавчины злаков *Puccinia recondita* [71]. Отмечается, что подавление бактериями *B. subtilis* GM5 развития гриба *F. oxysporum* на стадиях прорастания спор, формирования ростковых трубок обусловлено наличием у бактерий сурфактина и фенгицина, вызывающих аномальное ветвление гиф и их аномальное развитие [44, 72]. Под действием метаболитов бактерий рода *Bacillus* подавлялось прорастание спор фитопатогенных грибов, на мицелии образовывались вздутия, нарушалось функционирование мембран клеток мицелия, увеличивалась их проницаемость [44, 71, 73], а впоследствии уменьшалась спорулирующая активность, например, как у гриба *A. flavus* [45].

Выявлено, что эффективность действия штаммов *B. subtilis* NCD-2 против возбудителя ризоктониоза хлопчатника *R. solani* [74], D1/2 против возбудителя фузариоза зерновых культур *F. graminearum* [75], BS155 против *Magnaporthe grisea* [76] и GA1 против серой гнили яблок (гриб *B. cinerea*) [77] определяется наличием фенгицинов. Важно при этом заметить, что синтез бактериями *B. subtilis* GA1 фенгицина индуцировался в плодах, инфицированных грибом, но не в сильно пораженных [77]. Показано, что в антагонизме четырех штаммов *B. subtilis* по отношению к возбудителю болезни листьев дыни — грибу *Podosphaera fusca* ключевую роль играли липопептиды семейств итуринов и фенгицинов [73], а в защите бобовых растений от фитопатогена *Pythium ultimum* — фенгицины, продуцируемые *B. subtilis* [3]. Интересно, что фенгицин, выделенный из штамма *B. thuringiensis* CMB26, проявлял высокую токсичность не только в отношении возбудителя антракноза пер-



ца – гриба *Colletotrichum gloeosporioides*, но и гусениц капустной белянки (*Pieris rapae crucivora*) [78].

Наряду с проявлением антифунгальной активности четырех штаммов *B. subtilis* по отношению к возбудителю мучнистой росы огурца обнаружена их активность против возбудителей гнилей – бактерий *X. campestris* и *Pectobacterium carotovorum* [58]. При этом отмечено, что антифунгальная активность проявляется благодаря наличию липопептидов трех классов и сурфактина, и итурина, и фенгицина. Вместе с тем антибактериальную активность проявлял исключительно итурин [58]. В другой работе [79] после оценки *in vitro* и *in vivo* способности тунисского штамма *B. subtilis* синтезировать итурин и оказывать фунгицидный эффект предложено использовать его в качестве потенциальной основы нового препарата для защиты растений.

Способность подавлять рост 12 видов фитопатогенных грибов, в том числе из родов *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, а также возбудителей серой гнили томатов и мучнистой росы огурца и тыквы, проявляли клетки штамма бактерий *B. amyloliquefaciens* CNU114001 и итурин, выделенный из среды их культивирования [80]. Обнаружено, что итурин А, фенгицин и сурфактин ответственны за антагонистический эффект штаммов *B. amyloliquefaciens* S13-3 по отношению к возбудителю антракноза земляники [81], штаммов МЕР2 18 и АРР23 – к стеблевой гнили сои [41], а штамма РРСВ004 – семи фитопатогенов цитрусовых, поражающих плоды при хранении [82]. Из них итурин был самым сильным ингибитором роста возбудителей болезней *in vitro* [82]. Сурфактины штамма *B. amyloliquefaciens*, изолированного из апельсиновых деревьев, ингибировали рост гриба *F. oxysporum* [83], а итурин, плипастатин (стереоизомер фенгицина) и сурфактин штамма *B. amyloliquefaciens* S76-3, выделенного из колосьев пшеницы – рост гриба *F. graminearum* [84]. Показано, что у бактерий штамма *B. amyloliquefaciens* SQR9 ведущую роль в подавлении *F. oxysporum* играет бацилломицин D [12]. Ассоциированные с растениями штаммы *B. amyloliquefaciens* МЕР218 и АРР23, продуцирующие набор липопептидов, подавляли *in vitro* и *in vivo* рост гриба *Sclerotinia sclerotiorum* [41]. Другой штамм этой бактерии NJN-6 продуцировал три гомолога итуринов и два гомолога фенгицинов, которые подавляли рост гриба *F. oxysporum* [84].

Схожесть природы ингибирующего эффекта самих клеток *Bacillus* spp. SS-12.6 и экстракта липопептидов, полученного из культурального фильтрата, по отношению к пятнадцати видам грибов, поражающих лекарственные растения, подтверждает ключевую роль липопептидов в антифунгальном действии штамма [85]. Точно также, антифунгальный эффект по отношению к

грибу *S. sclerotiorum* штаммов бактерий *Bacillus* sp. В19, *Bacillus* sp. P12 и *B. amyloliquefaciens* В14, выделенных из почв провинции Сальта (Аргентина) и стимулирующих рост растений фасоли сорта Алюбия, связан с синтезом ими липопептидов, особенно в составе консорциума [86]. Выяснилось, что штаммы с более высоким содержанием липопептидов и широким спектром их изомеров обладали более сильным аддитивным или синергическим антагонизмом в отношении патогенной микрофлоры [6, 87].

Интересные результаты получены при исследовании бактерий, у которых природная способность синтезировать те или иные липопептиды была искусственно отключена [28, 45, 88]. Так, с использованием штаммов *B. subtilis* ВВГ231 (srfAA-) и ВВГ232 (srfAC-), мутантных по гену, кодирующему сурфактин-синтетазу, а также штаммов ВВГ235 и ВВГ236 с подавленным синтезом полинуклеотид-фосфорилазы (polynucleotide phosphorylase, **PNPase**) показано, что эти ферменты важны в синтезе фенгицина, а их дефицит снижает антигрибковую активность штаммов по отношению к *B. cinerea* [88]. С использованием бактериальных линий *B. subtilis* УТВ1 с искусственно нарушенной экспрессией бацилозин-синтетазы обнаружено многократное снижение фунгицидной активности по отношению к грибу *A. flavus*, а также восстановление его спорулирующей активности [45]. Такие линии бактерий слабее разрушали афлатоксины гриба *A. flavus*. Линии бактерий *B. subtilis* HS3 с нарушенным синтезом фенгицина и сурфактина ( $\Delta$ sfp), полученные методом геномного редактирования с использованием системы CRISPR-Cas9, теряли антифунгальную активность по отношению к грибам *Rhizoctonia solani* и *F. culmorum* [28].

Комплексный анализ антифунгальной активности сурфактинов, выделенных из бактериальных культур *B. amyloliquefaciens* KB3 и *B. subtilis* QST-713 (коммерческий продукт Cease “Bioworks Inc.”, США), выявил антагонизм против грибов *R. solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum coccodes* и *F. oxysporum in vitro* и *in planta* [89], а липопептидов *B. velezensis* LM2303 – против возбудителя фузариоза колоса – *F. graminearum* [67]. Липопептиды штамма *Bacillus methylotrophicus* (syn. *B. velezensis*) ХТ1 СЕСТ 8661 проявляли высокую эффективность защиты плодов томатов, винограда и клубники от возбудителя серой гнили *B. cinerea* при хранении [72], а штамма *B. subtilis* GA1 – яблок [77]. Основываясь на антифунгальных свойствах липопептидов, которые они проявляют в относительно низких концентрациях (до 5 мг/л), обусловленных в том числе эффектом ПАВ, их рекомендуют в качестве усилителей некоторых антибактериальных препаратов. Так, использование красного антибактериального пигмента продигозина в сочетании с сурфактином – серраветтин W1 бактерий *Serratia marcescens* оказалось

более эффективным при подавлении роста бактерии *Corynebacterium glutamicum*, по сравнению с применением компонентов по отдельности [90]. Совместное применение микосубтилина (1.4 мг/л) и сурфактина (1.4 мг/л) позволяло на 82% подавить рост гриба *Zyoseptoria tritici* на растениях пшеницы сорта Dinosog [91]. Интересно, что в других сочетаниях липопептиды, например, микосубтилин + сурфактин + фенгицин, или сурфактин + фенгицин, проявляли защитный эффект в более высоких концентрациях. В работе [6], показано, что выделенные из культуры *B. subtilis* микосубтилин в сочетании с фенгицином или субтилином проявляли синергический фунгицидный эффект против гриба *F. oxysporum* f. sp. *iridacearum*, вызывающего гнили корневых ириса, уже в концентрации 5 мг/л, что почти в 100 раз меньше рекомендуемой дозы системного фунгицида Torsin M (“Nippon Soda Co.”, Япония). Кроме того, есть информация о сенсibiliзирующей активности липопептидов, выделенных из культуры *B. amyloliquefaciens* JCK-12 при использовании химических фунгицидов, контролирующих развитие фузариоза колоса *F. graminearum* [87].

Показано, что липопептиды бацилл обладают избирательной инсектицидной активностью. Так, ряд изомеров сурфактина, выделенных из культурального фильтрата штамма *B. clausii* DTM1, проявляли инсектицидную активность против тлей, но не против личинок капустной моли *Plutella xylostella* и кукурузного жука *Diabrotica balteata*, а также гербицидную активность против мятлика однолетнего, но не арабидопсиса [23]. При этом у изоС<sub>13</sub>[Leu<sup>7</sup>] сурфактина обнаружена инсектицидная активность и в отношении личинок капустной моли. О способности сурфактинов бактерий *B. amyloliquefaciens* G1 эффективно защищать растения от тлей сообщалось в работах [92, 93], а ларвицидную активность против гусениц мельничной огневки *Ephestia kuehniella* выявили у сурфактинов бактерий *B. subtilis* SPB1 [94]. При оценке способности трех изомеров сурфактина С<sub>14</sub>[Leu<sup>7</sup>], С<sub>14</sub>[Val<sup>7</sup>] и С<sub>15</sub>[Leu<sup>7</sup>] проявлять инсектицидную активность против персиковой тли *Myzus persicae*, было обнаружено, что замена лейцина на валин в структуре липопептида приводит к ухудшению соответствующего показателя [95]. Несомненный интерес представляют и данные о способности сурфактинов штамма *B. subtilis* subsp. *subtilis* (VCRC B471) уменьшать численность личинок комаров [96]. Многократное уменьшение массы личинок листовой кукурузной совки *Spodoptera frugiperda* и увеличение показателя их смертности обнаружены при инокуляции растений бактериями *B. amyloliquefaciens*, выделенными из семян хосты сорта “Blue Umbrella” [97]. Сурфактины, выделенные из культурального фильтрата штамма *B. amyloliquefaciens* AG1, были

эффективны в подавлении развития личинок египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis* и томатной минирующей моли *Tuta absoluta* [98]. Показано, что они вызвали у насекомых нарушение работы кишечника и при этом не конкурировали с инсектотоксином Vip3Aa16 *B. thuringiensis* за рецепторы, аддитивно усиливая инсектицидную активность при совместном применении [98], что предполагает возможное использование консорциума подобных штаммов или даже их метаболитов в качестве эффективного инсектицидного препарата. Нарушение работы кишечника личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* после кормления растениями картофеля, предварительно инокулированными продуцирующим сурфактин штаммом эндофитной бактерии *B. subtilis* 26Д, наблюдалась также в работах [99, 100].

Помимо прямого биоцидного действия сурфактины и фенгицины *B. subtilis* предотвращают адгезию конкурентных организмов на поверхности корней растений [56]. Гонд с соавт. [43] показали, что эндофитные штаммы *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, продуцирующие сурфактин-синтетазу, а также культуральные фильтраты бактерий, ингибировали развитие гриба *F. moniliforme* как в условиях *in vitro*, так и на растениях кукурузы *in vivo*. Продуцирующий сурфактин и лихенизин штамм *B. licheniformis* GL174 подавлял рост грибов *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria* spp. и *B. cinerea* как в культуре *in vitro*, так и *in vivo* на растениях винограда [101].

Перспективность применения бактерий для повышения урожайности сельскохозяйственных культур и улучшения их качества может быть связана не только с биоцидными свойствами, но и способностью разрушать метаболиты фитопатогенов, например микотоксины, токсичные не только для растений, но и человека. В качестве примера можно привести представителей *Bacillus* spp., у которых при культивировании *in vitro* была выявлена высокая афлатоксин-деградирующая активность *B. subtilis* UTBSP1, *Bacillus* sp. TUBF1, *B. licheniformis* CFR1, а также бактерию *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [65]. Интересен также штамм *B. subtilis*-2006В – основа коммерческого препарата “Микосубтил”, способный к деградации в кормах до 95% афлатоксина В1 гриба *A. flavus* и Т-2 токсина *F. sporotrichiella* [102].

**Антивирусная активность бактериальных метаболитов.** Информация о вируцидной активности метаболитов (липопептидов) ризосферных и эндофитных бактерий, в том числе рода *Bacillus*, весьма противоречива. Сообщается, что в растениях томатов, обработанных клетками *B. subtilis* М-22, наблюдалось значительное усиление развития некрозов и накопление вирусных частиц,

вызывающих мозаику табака, в сравнении с контрольными растениями [103].

В тоже время, накапливаются многочисленные сведения об эффективной защите растений от вирусов препаратами на основе ризосферных и эндофитных бактерий и их метаболитов. Так, еще в 1965 г. Манн [104] обратил внимание на уменьшение степени поражения растений табака вирусом мозаики (ВТМ) после обработки растений культурой клеток и культуральной жидкостью бактерий *B. uniflagellatus*. Препарат, содержащий консорциум штаммов (PGPMC-1) *B. licheniformis* MML2501 + *Bacillus* sp. MML2551 + *Pseudomonas aeruginosa* MML2212 + *Streptomyces fradiae* MML1042, существенно уменьшал поражение растений подсолнечника вирусом некроза [105], а добавление к нему штаммов *Streptomyces* sp. PM5 и *Trichothecium roseum* MML005 усиливало этот защитный эффект [106]. Обработка консорциумом штаммов *B. amyloliquefaciens* IN937a, *B. pumilus* SE34 и *B. pumilus* T4 семян папайи и томатов способствовала в дальнейшем защите растений от вирусов кольцевой пятнистости и хлоротичной пятнистости соответственно [107]. Джетианон с соавт. [108] показали, что применение комплексного препарата “PGPR mixture”, содержащего клетки *B. amyloliquefaciens* IN937a и *B. pumilus* IN937b, защищало растения огурца от вируса мозаики. Применение препаратов, содержащих бактерии *Bacillus* spp., уменьшало степень поражения томата вирусом крапчатой мозаики, как в полевых условиях, так и в условиях закрытого грунта [109]. Предобработка почвы перед посевом табака бактерией *Pseudomonas putida* A3 уменьшала степень поражения растений вирусом ВТМ по сравнению с контролем без обработки почвы, а также обработкой почвы после посева. Комплексная оценка изолятов *Bacillus* spp., выделенных из ризосферы и тканей растений хлопчатника, по способности защищать от табачного стрик вируса выявила, что обработка растений суспензионной культурой эффективно уменьшала титр вирусов в растительных тканях [110]. Ризосферные бактерии *B. amyloliquefaciens* FZB24 и FZB42, внесенные в почву, способствовали меньшему проявлению симптомов вируса мозаики на листьях табака и уменьшению титра вируса в растительных тканях [111]. Применение бактерий штамма *B. amyloliquefaciens* MBI600, основы биофунгицида Serifel® (“BASF”, Германия), эффективно защищало растения томата от вируса пятнистого увядания, а картофеляля – от вируса Y [112].

Таким образом, в научной литературе накопилось довольно много данных о позитивном эффекте бактерий и их метаболитов в защите растений от вирусной инфекции. Механизмы защиты растений от вирусной инфекции с участием стимулирующих рост растений микроорганизмов и их метаболитов могут быть различными. Во-пер-

вых, бактерии (метаболиты) непосредственно сами могут связывать и разрушать вирусные частицы, что может быть следствием синтеза бактериями протеаз, нуклеаз и липопептидов [113]. Так обнаружено, что клетки *P. putida* A3 непосредственно разрушают частицы вируса в течение 30 мин в соке из листьев табака, инфицированных ВТМ [114]. Во-вторых, биоцидная активность липопептидов [93] предполагает, что они способны проявлять вируцидность опосредовано, так как бактерии (фитопатогенные), простейшие, грибы, нематоды и насекомые-фитофаги могут быть векторами-переносчиками большого числа вирусных инфекций растений. Например, обнаружено, что изолят *B. subtilis* BS3A25 и его культуральный фильтрат сдерживали развитие вируса мозаики огурца на растениях томата посредством угнетения развития переносчика этого заболевания – бахчевой тли *Aphis gossypii* [115]. Продуцирующие сурфактин бактерии *B. subtilis* BMG02 эффективно защищали растения томатов от мозаики [27], что может быть связано с аффицидностью этого липопептида [92, 93]. Показано, что многократное уменьшение степени поражения свеклы ризоманией, вызываемой вирусом некротического пожелтения жилок (BNYVV), при обработке растений клетками бактерией *B. amyloliquefaciens* было связано со значительным уменьшением численности плазмодиофорового псевдогриба *Polymyxa betae* – переносчика этого вируса, а также экспрессией растительных генов, кодирующих защитные белки, например, PR-8 и NPR-1 [116]. В-третьих, ассоциированные с растениями бактерии, могут эффективно защищать их от вирусов через активацию системной устойчивости хозяина различными микробными паттернами, в том числе и липопептидами [111, 112].

**Липопептиды и фитоиммунитет.** В потоке работ, характеризующих способность бактерий индуцировать защитные системы растений, особый интерес представляет информация о регуляции липопептидами функционирования компонентов фитозащитной системы. Способность липопептидов регулировать различные системы иммунитета растений доказывается различными методами, например с помощью: 1) сравнительного анализа свойств штаммов и линий с различным статусом накопления тех или иных липопептидов; 2) изменений условий совместного культивирования растений и эндофитных бактерий [34]; 3) целенаправленного нарушения структуры конкретных генов, ответственных за синтез липопептидов, с использованием векторов, например содержащих CRISPR-Cas9 [28] или транспозон Tn10 [53], приводящих к подавлению продукции этих антибиотиков.

Иммунная система животных и защитная система растений распознаёт бактериальные липопептиды благодаря их взаимодействию с рецеп-

торными белками плазмалеммы, в том числе Toll-подобными рецепторами, относящимися, например, у животных к подгруппе “TLR2” (TLR1, TLR2 и TLR6) [117]. В растениях арабидопсиса интерлейкин-подобные рецепторы TIR, содержащие нуклеотидсвязывающий сайт и рецепторы, содержащие богатые лейцином повторы, участвовали в системной индуцированной устойчивости, активированной клетками *B. cereus* AR156, против гнили, вызываемой *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 [118].

Ассоциированные с растениями микроорганизмы (*Pseudomonas* sp. и *Bacillus* sp.) индуцируют фитоиммунную систему хозяев через механизм запуска жасмонат-этиленового сигнального пути, опосредованного сигнальным белком NRP-1, с участием бактериальных детерминантов, в том числе и липопептидов [87, 99]. Показано, что штамм *B. subtilis* BBG111 запускает устойчивость к возбудителю ризоктониоза *R. solani* в ризосфере риса, по меньшей мере, благодаря секреции фенгицина и сурфактина, вызывая реакцию сверхчувствительности и гибель клеток, причем иммунные реакции развиваются по жасмонат/этилен-, АБК- и ауксинзависимым сигнальным путям, что блокирует рост и развитие патогена на ранней стадии патогенеза [119].

Штамм *B. subtilis* 168 – продуцент сурфактина и фенгицина, усиливал устойчивость растений томатов и фасоли к грибу *B. cinerea*, посредством активации ферментов липоксигеназного пути [3], ответственных за синтез жасмоновой кислоты, регулирующей системно индуцированную устойчивость. Сурфактин индуцировал СИУ к болезням у растений фасоли, дыни, томата, табака и винограда, тогда как фенгицин – защитный ответ у картофеля, томатов и табака [120]. Обработка корней томатов липопептидом массетолд А из бактерии *P. fluorescens* повышала устойчивость листьев растений к оомицету *P. infestans* [20]. Клетки бактерий *B. amyloliquefaciens* 5113, продуцирующие сурфактин, индуцировали устойчивость растений рапса к грибу *B. cinerea* [121], также как бактерии *B. amyloliquefaciens* FZB42 – устойчивость растений латука к *R. solani* через жасмонат/этилен-зависимый сигнальный защитный путь экспрессии гена *PDF 1.2* [122]. Рекомбинантные штаммы *B. amyloliquefaciens* FZB42, дефицитные по синтезу сурфактина (CH1), а также и сурфактина, и фенгицина, и бацилломицина Д (CH5) теряли способность индуцировать устойчивость растений салата к ризоктониозу [122].

Известно, что в культуре растительных клеток фенгицины индуцировали экспрессию генов, кодирующих ферменты фенолпропаноидного пути [56], а сурфактины – зависимое от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  подщелачивание среды, активную продукцию  $\text{H}_2\text{O}_2$  [57] и ряд компонентов оксипипиновой сигналь-

ной защитной системы [35, 123]. До недавнего времени было принято считать, что способностью вызывать устойчивость растений к болезням обладают только два семейства циклических липопептидов – сурфактины и фенгицины, однако недавние исследования доказывают наличие таких свойств и у итуринов [120, 124].

Показано, что в запуске защитной антибактериальной активности линий *B. subtilis* против листовой пятнистости и гнили тыквенных, соответственно вызываемых бактериями *X. campestris* pv. *cucurbitae* и *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* важен итурин [57]. Микосубтилин, относящийся к группе итуринов, запуск защитных реакции у растений винограда [120], а липопептиды *B. methylotrophicus* XT1 СЕСТ 8661 активировали антиоксидантную защитную систему плодов томата, винограда и клубники при хранении, что, по мнению авторов работы, является важным компонентом в последующей их защите от серой гнили [72]. Опрыскивание плодов цитрусовых культурой клеток штамма *B. amyloliquefaciens* DH-4, продуцирующего комплекс липопептидных метаболитов, эффективно защищало их от поражения грибом *Penicillium digitatum* [13].

Запускаемая эндофитами и их метаболитами устойчивость сохраняется в растениях долгое время, описывается в научной литературе термином “прайминг” и эффективно функционирует против патогенов даже в условиях хранения [125], наряду и с прямым биоцидным действием штаммов и их метаболитов на патогенов [126]. Она проявляется в каскадном раннем, быстром и многократном накоплении уровня активных форм кислорода в начале инфицирования, в запуске экспрессии редокс-чувствительных трансфакторов и генов PR-белков, а также в регуляции взаимодействия сигнальных путей. Так, обработка томата клетками ризобактерии *P. putida* LSW17S индуцировала быстрое накопление транскриптов PR-генов и продукцию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в инфицированных *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 растениях, что ингибировало развитие патогена. Уменьшение степени развития гриба *Rhizopus stolonifer* на плодах персика, обработанных клетками *B. cereus* AR156 и *B. subtilis* SM21, было связано с генерацией  $\text{H}_2\text{O}_2$ , увеличением экспрессии генов хитиназы,  $\beta$ -1,3-глюканазы и фенилаланин-аммиак-лиазы и активностью их белковых продуктов [118]. Штаммы *B. subtilis* BSCBE4 и *P. chlororaphis* PA23 повышали активность пероксидазы и полифенолоксидазы в проростках перца, инфицированных *Pythium aphanidermatum* [110]. Обработка томата клетками *B. thuringiensis* сероваров *fukuokaensis* B88-82, *sotto* RG1-6, *indiana* RG5-17, *israelensis*, *japonensis* N141 и *tohokuensis* уменьшала степень поражения растений патогеном *Ralstonia solanacearum*, вызывающим вилт, что сопровождалось дифференциальной

активацией в растениях генов PR-1, кислой хитиназы и глюканазы, ответственных за салицилатный путь развития защитных реакций [127].

Выявлено, что регуляторная активность самих клеток бактерий и метаболитов *B. amyloliquefaciens* FZB42 [128] и *B. cereus* AR156 [129] связана со способностью ингибировать, с участием растительных малых РНК *miR846* и *miR825/825* соответственно, естественный механизм РНК-интерференции генов супрессоров жасмонатной защитной системы. Анализ экспрессии малых РНК *miR167* и *miR393* в растениях табака, инокулированных бактерией *B. subtilis* ATCC21332 и, впоследствии, инфицированных клетками патогена *Agrobacterium tumefaciens* IBRCM10701, выявил дифференциальный характер этого процесса, связанный с многократным транзитным накоплением этих РНК в инфицированных, но не бактериализованных растениях, который предотвращался в бактериализованных [130]. Авторы [130] выдвигают предположение, что в этой регуляторной системе, индуцирующей накопление флавоноидов, участвуют липопептиды *B. subtilis*.

Например, известно, что под влиянием ризосферных бактерий и их метаболитов в растениях экспрессируются гены, кодирующие защитные белки класса PR-4 и PR-10 [43, 131] с противовирусной активностью и, в том числе рибонуклеазной активностью. Маурхофер с соавт. [132] показали системное накопление салициловой кислоты и экспрессию защитных белков PR-1 в растениях табака под влиянием бактерий *P. fluorescens* CHA0, сопровождающуюся уменьшением степени инфицирования вирусом табачной мозаики. Выдвигается предположение, что и сами бактерии *P. fluorescens* могут синтезировать салициловую кислоту, наряду с низкомолекулярными липопептидами, например, псевдобактином [133]. Несмотря на то, что полученные данные предполагают участие псевдомонад в защите растений и через путь системной индуцированной устойчивости, опосредованный липопептидами, связанный с генерацией активных форм кислорода и запускающийся салициловой кислотой, использование клеток бактерий *P. fluorescens*, мутантных по синтезу этой сигнальной молекулы и псевдобактина, не доказало это предположение [133].

Это противоречит информации о том, что обработка томата клетками *B. amyloliquefaciens* MBI600 индуцировала устойчивость растений к вирусам пятнистого увядания томатов и Y-вирусу картофеля, сопровождающуюся экспрессией генов салицилат-индуцированного пути [112]. Важно отметить, что накопление PR-белков под влиянием эндофитных бактерий, например штамма *B. amyloliquefaciens* 5B6, сопровождалось уменьшением степени поражения растений вирусной инфекцией [131]. Показано, что в многократном снижении

степени поражения растений свеклы ризоманией, вызываемой вирусом некротического пожелтения жилок (BNYVV), при обработке растений бактерией *B. amylolequifaciens* важную роль играет экспрессия генов защитных белков PR-8, NPR-1 [116].

Снижение пораженности растений банана вирусом *Banana bunchy top virus* (BBTV) с конечной эффективностью до 80% под влиянием обработкой консорциумом ризосферной бактерий *Pseudomonas fluorescens* Pf1 и эндофитного штамма *Bacillus* spp. EPB22 и их метаболитов коррелировало с активацией пероксидазы, полифенолоксидазы и фенилаланин-аммиаклиазы, а также накоплением фенольных соединений [134]. Устойчивость к вирусу мозаики растений табака под влиянием бактерии *Paenibacillus lentimorbus* B-30488 была связана с экспрессией генов патоген-индуцируемых белков, генерацией активных форм кислорода и накоплением лигнина [135]. Берис с соавт. [112] объясняют формирование устойчивости томатов к вирусу пятнистого увядания и вирусу картофеля Y под влиянием бактерий, ассоциированных с растениями, сочетанной индукцией экспрессии генов защитных белков, преимущественно салицилатного и, частично, жасмонатного сигнальных путей. Бактерии *B. subtilis* BMG02, продуцирующие сурфактин, формировали устойчивость растений томата к вирусу мозаики ToMV и экспрессию генов, кодирующих фенилаланин-аммиаклиазу и 1,3-глюканазу [27]. Авторы полагают, что защитные системы, индуцируемые бактериями, запускаются с участием генов как салицилатного, так и жасмонатного сигнальных путей.

В последнее время стали появляться работы, свидетельствующие об эффективном развитии иммунной реакции растений под влиянием бактерий и их метаболитов в ответ на заселение растений насекомыми. Так, показана дифференциальная индуцированная экспрессия защитных генов в иммунизированных *B. velezensis* YC7010 растениях риса после заселения дефальцидами *Nilaparvata lugens* Stål. [136]. Доказано, что в индукции бактериями устойчивости растений риса к дефальцидам участвует циклический липопептид бацилопептин.

\* \* \*

Биологическая защита растений от вредных организмов приобретает всё большее значение в растениеводстве в связи с усилением антропогенной нагрузки на окружающую среду и необходимостью обеспечения безопасности продуктов питания. Перспективными объектами для разработки биопрепаратов являются бактерии, и, особенно, представители рода *Bacillus*, благодаря возможности спорообразования и повышенной их жизнеспособности в сухой форме, относительно экономически эффективным методам

культивирования и множеству не опасных для человека видов. Способность бактерий одного и того же штамма (линии) продуцировать одновременно антибиотики всех трех классов (сурфактинов, итуринов, фенгицинов) и/или одного класса, но с комплексной активностью, увеличивает шансы на успех поиска в природе микробов с заданными свойствами. К настоящему времени описано множество липопептидов, проявляющих антибактериальные, фунгицидные, противовирусные и инсектицидные свойства [1]. Особый интерес представляет и то, что, наряду с избирательной антибиотической активностью против широкого спектра патогенов и вредителей, они могут индуцировать защитные и ростовые реакции в растениях и изменять структуру патогенного микробиома, что особенно актуально при практическом применении эндофитов – продуцентов этих метаболитов. Необходимость таких работ подтверждается интересными для практики данными о том, что штамм бактерий *B. subtilis* 26Д обладает способностью изменять структуру микробиоты кишечника такого вредителя картофеля, как колорадский жук [99, 100], и, таким образом ухудшать поедаемость растений насекомыми. Ризосферные и эндофитные бактерии, могут выступать против фитопатогенов и вредителей мощным оружием с “различным характером поражающего действия” и представлять интерес для биоконтроля.

Перспективным направлением в изучении свойств бактерий, особенно эндофитных, в составе микробиома растений является выявление способности микроорганизмов к деструкции микотоксинов. Полученная с использованием бактерий, синтезирующих липопептиды, продукция, не содержащая с одной стороны пестициды, а с другой токсины патогенных микроорганизмов окажется востребованной в животноводстве и пищевой промышленности [137].

Обширную область исследования представляют способности метаболитов бактерий, в том числе липопептидов, индуцировать устойчивость растений к болезням [3]. Выявлено, что некоторые эндофитные бактерии активируют устойчивость растений через индукцию защитных реакций, регулируемых жасмонатной и салицилатной сигнальными системами [89, 99, 121, 122]. Изучение таких механизмов важно для разработки комплексных микробиологических препаратов, содержащих регуляторы роста растений, микро- и макроэлементы, так как компоненты, вводимые в бактериальную массу или метаболиты могут блокировать сигнальные пути и приводить к неожиданным эффектам в защите растений.

Как указывалось выше, не только защитная система растений, но и иммунная система животных распознаёт бактериальные липопептиды

благодаря их взаимодействию с рецепторными белками плазмалеммы, в том числе Toll-подобными рецепторами, относящимися у животных к подгруппе “TLR2” (TLR1, TLR2 и TLR6) [117]. Работы в области изучения механизмов их взаимодействия с растительной клеткой могут пролить свет и на механизмы проявления биологической активности бактерий по отношению к инфекционным и онкологическим болезням животных и человека, что открывает перспективы создания актуальных для ветеринарии и медицины препаратов [137, 138].

Общность механизмов действия липопептидов, как на патогены растений, так и человека позволяет создавать новые пробиотические и лечебные препараты на основе эндофитных и ризосферных микроорганизмов – продуцентов липопептидов. Таким образом, поиск высокоэффективных штаммов бактерий, синтезирующих целевые липопептиды, изучение их свойств востребованы не только в растениеводстве, но и в отраслях, связанных с ветеринарией, пищевой промышленностью и фармацевтикой.

Работа выполнена в рамках научного гранта РФФИ-офи\_м № 17-29-08014 и частично (в плане антивирусной активности) при финансовой поддержке совместного международного гранта РФФИ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № 19-46-02004.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. // J. Biotechnology. 2018. V. 285. № 1. P. 44–55.
2. Zacharofa M.P., Lovitt R.W. // Probiotics Antimicrob Proteins. 2012 V. 4. № 3. P. 187–197.
3. Ongena M., Henry G., Thonart P. // Recent Developments in Management of Plant Diseases (Plant Pathology in the 21st Century). V. 1. Eds. Gisi U., Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer Science Business Media B.V., 2010. P. 59–69.
4. Сидорова Т.М., Астаурова А.М., Хомяк А.И. // Сельскохозяйственная микробиология. 2018. Т. 53. № 1. С. 29–37.
5. Jones T.S. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1949. V. 51. P. 909–916.
6. Mihalache G., Balaes T., Gostin I., Stefan M., Coutte F., Krier F. // Environ Sci. Pollut. Res. Int. 2018. V. 25. № 30. P. 29784–29793.
7. Grady E.N., MacDonald J., Ho M.T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Renaud J., Yuan Z.C. // BMC microbiology, 2019. V. 19. № 1. Art. 5. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
8. Abdellaziz L., Chollet M., Abderrahmani A., Béchet M., Yaici L., Chataigné G., Arias A.A., Leclère V., Jacques P. // Arch. Microbiol. 2018. V. 200. № 8. P. 1205–1216.
9. Fiedler S., Heerklotz H. // Biophys. J. 2015. V. 109. P. 2079–2089.
10. Perez K.J., Viana J.D., Lopes F.C., Pereira J.Q., Dos Santos D.M., Oliveira J.S. // Front. Microbiol.

2017. V. 8. Art. 61.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00061>
11. *Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Sussmuth R., Piel J., Borris R.* // J. Bacteriol. 2009. V. 140. № 1. P. 27–37.
  12. *Xu W.F., Ren H.S., Ou T., Lei T., Wei J.H., Huang C.S., Li T., Strobel G., Zhou Z.Y., Xie J.* // Microb. Ecol. 2018. V. 3. № 1. P. 1–13.
  13. *Chen L., Heng J., Qin S., Bian K.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 6. Art. e0198560.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>
  14. *Pinto C., Sousa S., Froufe H., Egas C., Clément C., Fontaine F., Gomes A.C.* // Stand. Genomic Sci. 2018. V. 13. Art. 30.  
<https://doi.org/10.1186/s40793-018-0327-x>
  15. *Ma J., Wang C., Wang H., Liu K., Zhang T., Yao L., Zhao Z., Du B., Ding Y.* // Biomed. Res. Int. 2018. V. 6. Art. 9473542.  
<https://doi.org/10.1155/2018/9473542>
  16. *Abderrahmani A., Tapi A., Nateche F., Chollet M., Leclère V., Wathelet B., Hacene H., Jacques P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 92. № 3. P. 571–581.
  17. *Fahim S.* // Int. J. Chem. Tech. Research. 2017. V. 10. № 6. P. 1096–1103.
  18. *Roy A., Mahata D., Paul D., Korpole S., Franco O.L., Mandal S.M.* // Front. Microbiol. 2013. V. 4. Art. 10–3389.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00332>
  19. *Arima K., Kakinuma A., Tamura G.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. V. 31. № 3. P. 488–494.
  20. *Tran H., Ficke A., Asiimwe T., Höfte M., Raaijmakers J.M.* // New Phytol. 2007. V. 175. № 4. P. 731–742.
  21. *Roongsawang N., Washio K., Morikawa M.* // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. № 1. P. 141–172.
  22. *Peypoux F., Bonmatin J.M., Wallach J.* // Eur J Biochem. 1994. V. 224. № 1. P. 89–96.
  23. *Guo D.L., Wan B., Xiao S.J., Allen S., Gu Y.C., Ding L.S., Zhou Y.* // Natural Product Com. 2015. V. 10. № 12. P. 2151–2153.
  24. *Price N., Rooney A.P., Swezey J.L., Perry E., Cohan F.M.* // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 271. P. 83–89.
  25. *Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Яковлева О.В., Курченко В.П.* // Патент РФ № 2270858. 2004. Бюл. № 6 от 27.02.2006.
  26. *Zhao J., Zhang C., Lu Z.* // Braz J. Microbiol. 2018. V. 49. Suppl. 1. P. 166–177.
  27. *Hussein W., Awad H., Fahim S.* // Am. J. Microbiol. Res. 2016. V. 4. № 5. P. 153–158.
  28. *Yi Y., Li Z., Song C., Kuipers O.P.* // Environ Microbiol. 2018. V. 20. № 12. P. 4245–4260.
  29. *Dang Y., Zhao F., Liu X., Fan X., Huang R., Gao W., Wang S., Yang C.* // Microb. Cell Fact. 2019. V. 18. № 1. Art. 68.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1121-1>
  30. *Елицеев С.А., Шульга А.П., Карпенко Е.В.* // Микробиологический журнал. 1990. Т. 52. № 3. С. 41–44.
  31. *Abushady H.M., Bashandy A.S., Ibrahim H.M.M.* // Int. J. Agricult. Biol. 2005. V. 7. № 3. P. 337–344.
  32. *Qian S., Sun J., Lu H., Lu F., Bie X., Lu Z.* // Process Biochem. 2017. V. 58. № 2. P. 224–229.
  33. *Chen M.C., Wang J.P., Zhu Y.J., Liu B., Yang W.J., Ruan C.Q.* // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 126. № 5. P. 1519–1529.
  34. *Pertot I., Puopolo G., Hosni T., Pedrotti L., Jourdan E., Ongena M.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 86. № 3. P. 505–512.
  35. *Cawoy H., Debois D., Franzil L., De Pauw E., Thonart P., Ongena M.* // Microb. Biotechnol. 2015. V. 8. № 2. P. 281–295.
  36. *Cao Y., Pi H., Chandrangsu P., Li Y., Wang Y., Zhou H., Xiong H., Helmann J.D., Cai Y.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. Art. 4360.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
  37. *Matilla M., Daddaoua A., Chini A., Morel B., Krell T.* // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. № 21. P. 11229–11238.
  38. *Beauregard P.B., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.* // PNAS. USA. 2013. V. 110. № 17. P. 1621–1630.
  39. *Debois D., Fernandez O., Franzil L., Jourdan E., de Brogniez A., Willems L., Clément C., Dorey S., De Pauw E., Ongena M.* // Env. Microb. Rep. 2015. V. 7. № 3. P. 570–582.
  40. *Kinsella K., Schulthess C., Morris T.F., Stuart J.D.* // Soil. Biol. Biochem. 2009. V. 41. № 2. P. 374–379.
  41. *Alvarez F., Castro M., Príncipe A., Borioli G., Fischer S., Mori G., Jofré E.* // J. Appl. Microbiol. 2012. V. 112. № 1. P. 159–174.
  42. *Zhao X., Zhou Z.J., Han Y., Wang Z.Z., Fan J., Xiao H.Z.* // Microbiol. Res. 2013. V. 168. № 9. P. 598–606.
  43. *Gond S.K., Bergen M.S., Torres M.S., White J.F.Jr.* // Microbiol. Res. 2015. V. 172. № 1. P. 79–87.
  44. *Mardanov A.M., Hadiyeva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R.* // Agricultural Sci. 2017. V. 8. № 1. P. 1–20.
  45. *Afsharmanesh H., Perez-Garcia A., Zerriouh H., Ahmadzadeh M., Romero D.* // Food Control. 2018. V. 94. № 1. P. 48–55.
  46. *Vanittanakom N., Loeffler W., Koch U., Jung G.* // J. Antibiot. 1986. V. 39. № 7. P. 888–901.
  47. *Scopes R.K.* // Analytical Biochemistry 1974. V. 59. № 1. P. 277–282.
  48. *Harborne B.* Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 2nd. Ed. London, New York: Chapman and Hall, 1984. 288 p.
  49. *Ong A., Wu J.C.* // Biocatalysis and Agricultural Biotechnol. 2018. V. 16. № 1. P. 121–125.
  50. *Alajlani M., Shiekh A., Hasnain S., Brantner A.* // Chromatographia. 2016 V. 79. № 21. P. 1527–1532.
  51. *Thavasi R., Sharma S., Jayalakshmi S.* // J. Pet. Environ. Biotechnol. 2011. S. 1:001.  
<https://doi.org/10.4172/2157-7463.S1-001>
  52. *Rosenberg E., Ron E.Z.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. № 1. P. 154–162.
  53. *Yazgan A., Ozcengiz G., Marahiel M.A.* // B.B.A.-Gene Struct. Expr. 2001. V. 1518. № 1. P. 87–94.
  54. *Yokota K., Yatsuda M., Miwa E., Higuchi K.* // J. ISSAAS. 2012. V. 18. № 1. P. 70–75.
  55. *Etchegaray A., de Castro Bueno C., de Melo I.S., Tsai S.M., Fiore M.F., Silva-Stenico M.E., de Mo-*

- raes L.A., Teschke O. // Archiv Microbiol. 2008. V. 190. № 6. P. 611–622.
56. Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. № 7. P. 869–878.
57. Zeriouh H., Romero D., Garcia–Gutierrez L., Cazorla F.M., de Vicente A., Perez–Garcia A. // Mol. Plant Microbe Interact. 2011. V. 24. № 12. P. 1540–1552.
58. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 1. P. 307–319.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
59. Гиззатуллина С.В., Лукманова К.А., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э., Ефимов Г.Е., Салихова Н.Х., Кайданек Т.В // Медицинский вестник Башкортостана. 2010. № 6. С. 92–95.
60. Bacon C.W., Hinton D.M., Mitchell T.R. // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 125. № 3. P. 867–875.
61. Gao W., Liu F., Zhang W., Quan Y., Dang Y., Feng J., Gu Y., Wang S., Song C., Yang C. // MicrobiologyOpen. 2017. V. 6. Art. e00398.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.398>
62. Gong Q., Zhang C., Lu F., Zhao H., Bie X., Lu Z. // Food Control. 2014. V. 36. № 1. P. 8–14.
63. Sun J., Li W., Liu Y., Lin F., Huang Z., Lu F., Bie X., Lu Z. // J. Stored Products Research. 2018. V. 75. № 1. P. 21–28.
64. Farzaneh M., Shi Z.-Q., Ghassempour A., Sedaghat N., Ahmadzadeh M., Mirabolfathy M., Javan–Nikkah M. // Food Control. 2012. V. 23. № 1. P. 100–106.
65. Джавахия В.Г., Стацюк Н.В., Щербакова Л.А., Поплетаева С.Б. Афлатоксины: ингибирование биосинтеза, профилактика загрязнения и деконтаминация агропродукции. М.: ООО “Ред. журнала “Достижения науки и техники АПК””, 2017. 162 с.
66. Adeniji A.A., Aremu O.S., Babalola O.O. // MicrobiologyOpen. 2018. V. 25. Art. e742.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.742>
67. Chen K., Tian Z., Luo Y., Cheng Y., Long C.A. // Phytopathology. 2018. V. 108. № 11. P. 1253–1262.
68. Jasim B., Sreelakshmi K.S., Mathew J., Radhakrishnan E.K. // Microb. Ecol. 2016. V. 72. № 1. P. 106–119.
69. Cho S.J., Lee S.K., Cha B.J., Kim Y.H., Shin K.S. // FEMS Microbiol Lett. 2003. V. 223. № 1. P. 47–51.
70. Leclere V., Bechet M., Adam A., Guez J.-S., Wathelet B., Ongena M., Thonart P., Gancel F., Chollet–Imbert M., Jacques Ph. // Appl. Env. Microbiol. 2005. V. 71. № 8. P. 4577–4584.
71. Morgan F.L. // Phytopathology. 1963. V. 53. P. 1346–1348.
72. Toral L., Rodríguez M., Béjar V., Sampedro I. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1315.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
73. Romero D., de Vicente A., Rakotoaly R.H., Dufour S.E., Veening J.W., Arrebola E., Cazorla F.M., Kuipers O.P., Paquot M., Pérez–García A. // Mol. Plant Microbe Interact. 2007. V. 20. № 4. P. 430–440.
74. Guo Q., Dong W., Li S., Lu X., Wang P., Zhang X., Wang Y., Ma P. // Microbiol. Res. 2014. V. 169. № 7–8. P. 533–540.
75. Chan Y-K., Savard M.E., Reid L.M., Cyr T., McCormick W., Seguin C. // BioControl. 2009. V. 54. № 4. P. 567–574.
76. Zhang L., Sun C. // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. Art. e00445-18.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>
77. Touré Y., Ongena M., Jacques P., Guirou A., Thonart P. // J. Appl. Microbiol. 2004. V. 96. № 5. P. 1151–1160.
78. Kim P.I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y.T. // J. Appl. Microbiol. 2004. V. 97. № 5. P. 942–949.
79. Mnif I., Ghribi D. // Crop Prot. 2015. V. 77. № 1. P. 52–64.
80. Ji S.H., Paul N.C., Deng J.X. Kim Y.S., Yun B.-S., Yu S.H. // Microbiology. 2013. V. 41. № 4. P. 234–242.
81. Yamamoto S., Shiraishi S., Suzuki S. // Lett. Appl. Microbiol. 2015. V. 60. № 4. P. 379–381.
82. Arreleda E., Jacobs R., Korsten L. // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 108. № 2. P. 386–395.
83. Vitullo D., Di Pietro A., Romano A., Lanzotti V., Lima G. // Plant Pathol. 2012. V. 61. № 5. P. 689–699.
84. Gong A.P., Li H.P., Yuan O.S. Song X.S., Yao W., He W.-J., Zhang J.-B., Liao Y.-C. // PLOS One. 2015. V. 10. № 2. Art. e0116871.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116871>
85. Dimkic I., Stankovic S., Nišavac M., Petković M., Ristivojević P., Fira D., Berić T. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 925.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00925>
86. Sabatè D.C., Brandan C.P., Petroselli G., Erra-Balsells R., Audisio M.C. // Microbiol Res. 2018. V. 211. № 1. P. 21–30.
87. Kim K., Lee Y., Ha A., Kim J.I., Park A.R., Yu N.H., Son H., Choi G.J., Park H.W., Lee C.W., Lee T., Lee Y.W., Kim J.C. // Front. Plant sci., 2017. V. 8. Art. 2010.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02010>
88. Yaseen Y., Diop A., Gancel F., Béchet M., Jacques P., Drider D. // Arch Microbiol. 2018. V. 200. № 5. P. 783–791.
89. Nam H.S., Yang H.-J., Oh B.J., Anderson A.J., Kim Y.C. // Plant Pathol. J. 2016. V. 32. № 3. P. 273–280.
90. Hage–Hülsmann J., Grünberger A., Thies S., Santiago–Schübel B., Klein A.S., Pietruszka J., Binder D., Hilgers F., Domrose A., Drepper T., Kohlheyer D., Jaeger1 K.E., Loeschcke A. // PLOS One. 2018. V. 13. № 7. Art. 0200940.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200940>
91. Mejri S., Siah A., Coutte F., Magnin–Robert M., Randoux B., Tisserant B., Krier F., Jacques P., Reignault P., Halama P. // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2018. V. 25. № 30. P. 29822–29833.
92. Yun D.C., Yang S.Y., Kim Y.C., Kim I.S., Kim Y.H. // J. Korean Soc. for Applied Biol. Chem. 2013. V. 56. № 6. P. 751–753.
93. Rodríguez M, Marín A, Torres M, Béjar V, Campos M, Sampedro I. // Front Microbiol. 2018. V. 9. Art. 3114.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>
94. Ghribi D., Elleuch M., Abdelkefi L., Ellouze–Chaabouni S. // J. Stored Products Research. 2012. V. 48. № 1. P. 68–72.
95. Yang S., Lim D., Noh M., Kim J., Kim Y., Kim I. // Entomological Research. 2017. V. 47. № 1. P. 55–59.
96. Geetha I., Paily K.P., Manonmani A.M. // Pest Management Science. 2012. V. 68. P. 1447–1450.



97. Li H., Soares M.A., Torres M.S., Bergen M., White Jr. J.F. // *J. Plant Interact.* 2015. V. 10. № 1. P. 224–229.
98. Ben Khedher S., Boukedi H., Dammak M., Kilani–Feki O., Sellami–Boudawara T., Abdelkefi–Mesrati L., Tounsi S. // *J. Invertebr. Pathol.* 2017. V. 144. P. 11–17.
99. Максимов И.В., Сорокань А.В., Нафикова А.Р., Беньковская Г.В. // *Микология и фитопатология.* 2015. Т. 49. № 5. С. 317–324.
100. Sorokan A., Benkovskaya G., Blagova D., Maksimov I. // *AIP Conference Proceedings.* 2063, 2019. Art. 020001. <https://doi.org/10.1063/1.5087308>
101. Nigris S., Baldan E., Tondello A., Zanella F., Vitulo N., Favaro G., Guidolin V., Bordin N., Telatin A., Barizza E., 2 Marcato S., Zottini M., Squartini A., Valle G., Baldan B. // *BMC Microbiol.* 2018. V. 18. № 1. Art. 133. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1306-5>
102. Иванов Е.Н., Еремеев И.М., Трemasов М.Я. // *Достижения науки и техники АПК.* 2012. № 3. С. 69–72.
103. Зорина Е.А., Фоминых Т.С., Новикова И.И. // *Вестник защиты растений.* 2016. Т. 2. № 88. С. 50–55.
104. Mann E.W. // *Phytopathology.* 1969. V. 59. № 5. P. 658–662.
105. Srinivasan K., Mathivanan N. // *Biol. Cont.* 2009. V. 51. № 3. P. 395–402.
106. Srinivasan K., Mathivanan N. // *J. Biopesticides.* 2011. V. 4. № 1. P. 65–72.
107. Abdalla O.A., Bibi S., Zhang S. // *Arch. Phytopathol. Plant Protec.* 2017. V. 50. № 11–12. P. 584–597.
108. Jetiyanon K., Fowler W.D., Kloepper J.W. // *Plant Dis.* 2003. V. 87. № 11. P. 1390–1394.
109. Murphy J.F., Zehnder G.W., Schuster D.J., Sikora E.J., Polston J.E., Kloepper J.W. // *Plant Dis.* 2000. V. 84. № 7. P. 779–784.
110. Vinodkumar S., Nakkeeran S., Renukadevi P., Mohankumar S. // *Agriculture, Ecosystems & Environment* 2018. V. 267. № 1. P. 42–51.
111. Wang S., Wu H., Qiao, J., Ma L., Liu J., Xia Y. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 19. № 10. P. 1250–1258.
112. Beris D., Theologidis I., Skandalis N., Vassilakos N. // *Scientific Reports.* 2018. V.8. № 1. Art. 10320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28677-3>
113. Sokurenko Y., Nadyrova A., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *BioMed Research International.* 2016. V.2016. Art. ID 4239375. <https://doi.org/10.1155/2016/4239375>
114. Yang P., Sun Z.X., Liu S.Y., Lu H.X., Zhou Y., Sun, M. // *Crop Protection.* 2013. V. 47. № 1. P. 17–23.
115. Sudhakar N., Thajuddin N., Murugesan K. // *Biocontrol Sci. and Technol.* 2011. V. 21. № 3. P. 367–386.
116. Desoignies N., Schramme F., Ongena M., Legrève A. // *Mol. Plant Pathol.* 2013. V. 14. № 4. P. 416–421.
117. Сорокина Е.В. // *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2012. № 2. С. 6–15.
118. Wang N., Wang L., Zhu K., Hou S., Chen L., Mi D., Gui Y., Qi Y., Jiang C., Guo J.-H. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 98. <https://doi.org/10.4014/jmb.0901.008>
119. Chandler S., Van Hese N., Coutte F., Jacques Ph., Hofte M., De Vleeschauwer D. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 91. P. 20–30.
120. Farace G., Fernandez O., Jacquens L. // *Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 16 № 2. P. 177–187.
121. Sarosh B.R., Danielsson J., Meijer J. // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 70. № 1–2. P. 31–45.
122. Chowdhury S.P., Uhl J., Grosch R., Alquéres S., Pittroff S., Dietel K., Schmitt–Kopplin P., Borriss R., Hartmann A. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015. V. 28. № 9. P. 984–995.
123. Rahman A., Uddin W., Wenner N.G. // *Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 16 № 6. P. 546–558.
124. Waewthongrak W., Leelasuphakul W., McCollum G. // *PloS one.* 2014. V. 9. № 10. art. e109386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109386>
125. Максимов И.В., Абизгильдина П.Р., Пусенкова Л.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2011. Т. 47. № 4. С. 373–385.
126. Lastochkina O., Seifikalhor M., Aliniaiefard S., Baymiev A., Pusenkova L., Garipova S., Kulabuhova D., Maksimov I. // *Plants.* 2019. V. 8. art. 97. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
127. Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T., Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Takahashi H. // *Microbes and environments.* 2012. V. 28. № 1. P. 128–134.
128. Xie S., Jiang H., Ding T., Xu Q., Chai W., Cheng B. // *Mol Plant Pathol.* 2018. V. 19. № 7. P. 1612–1623.
129. Niu D., Xia J., Jiang C., Qi B., Ling X., Lin S., Zhang W., Guo J., Jin H., Zhao H. // *J. Integr. Plant Biol.* 2016. V. 58. № 4. P. 426–439.
130. Nazari F., Safaie N., Soltani B.M., Shams–Bakhsh M., Sharifi M. // *Plant Physiol Biochem.* 2017. V. 118. № 1. P. 98–106.
131. Lee G.H., Ryu C.M. // *Plant Dis.* 2016. V. 100. № 10. P. 2099–2105.
132. Maurhofer M. // *Plant Pathol.* 1994. V. 44. № 1. P. 40–50.
133. Djavaheri M., Mercado–Blanco J., Versluis C., Meyer J.M., Loon L.C., Bakker P.A. // *Microbiology Open.* 2012. V. 1. № 3. P. 311–325.
134. Harish S., Kavino M., Kumar N., Balasubramanian P., Samiyappan R. // *Biological Control.* 2009. V. 51. № 1. P. 16–25.
135. Kumar S., Chauhan P.S., Agrawal L., Raj R., Srivastava A., Gupta S., Mishra S.K., Yadav S., Singh P.C., Raj S.K., Nautiyal C.S. // *PLOS One.* 2016. V. 11. № 3. Art. e0149980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149980>
136. Harun–Or–Rashid M., Kim H.J., Yeom S.I., Yu H.A., Manir M.M., Moon S.–S., Kang Y.J., Chung Y.R. // *Front Plant Sci.* 2018. V. 9. Art.1904. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01904>
137. Mingmongkolchai S., Panbangred W. // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 124. № 6. P. 1334–1346.
138. Karpiński T.M., Adamczak A. // *Pharmaceutics,* 2018. V. 10. № 2. Art. 54. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020054>

## Prospects of Application of Lipopeptides Producers Bacteria for Plant Protection (Review)

I. V. Maksimov<sup>a,\*</sup>, B. P. Singh<sup>b,\*\*</sup>, E. A. Cherepanova<sup>a</sup>, G. F. Burkhanova<sup>a</sup>, and R. M. Khairullin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

<sup>b</sup>*Department of biotechnology, Mizoram University, Aizawl, India*

<sup>\*</sup>*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru*

<sup>\*\*</sup>*e-mail: bhimpratap@gmail.com*

Received April 25, 2019; revised August 21, 2019; accepted August 30, 2019

The review provides current information on bacterial lipopeptides, mainly produced by representatives of the genus *Bacillus*, which play an important role in protecting plants against fungi, bacteria and viruses, exhibiting fungicidal, antibiotic, antiviral and insecticidal properties, phytoimmuno-modulating activity as well. The lipopeptides are given structural characteristics, the genes responsible for their synthesis, principal methods of isolation and quantitative and qualitative analysis are described. The protective mechanisms of plants that respond to lipopeptides and associated with signaling systems regulated by salicylates and jasmonates are indicated. Overview substantiates the prospect of searching for rhizosphere and endophytic strains to create biological products protecting plants from a complex of pathogens and pests, stimulating the growth and productivity of crops.

*Keywords:* plant protection, plant growth-promoting bacteria, lipopeptides, pathogens, systemic resistance of plants

УДК 541.64:547.96

## КОНФОРМАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ ПОЛИМЕРА-НОСИТЕЛЯ И АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТА

© 2020 г. И. Л. Валув<sup>1</sup>, \*, Л. В. Ванчугова<sup>1</sup>, Л. И. Валув<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 27.02.2019 г.

После доработки 22.06.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Изучена зависимость активности иммобилизованного трипсина от конформации макромолекулы полимера-носителя. Методом флуоресцентной спектроскопии показано, что иммобилизация фермента на жесткой полимерной глобуле предотвращала ассоциацию его молекул и обеспечивала доступность активных центров даже для высокомолекулярного субстрата.

**Ключевые слова:** трипсин, иммобилизация, декстран, полиакриламид

**DOI:** 10.31857/S0555109920010158

В современной прикладной биохимии и биотехнологии нашли широкое применение биологически активные соединения, главным образом ферменты, иммобилизованные на природном или синтетическом полимерном носителе [1]. Одним из условий успешного использования таких систем является правильный выбор носителя, при котором удастся существенно повысить время активного функционирования ферментов, изменить их каталитическую активность и специфичность действия, а также интенсифицировать технологические процессы с участием этих биологических катализаторов.

В предыдущих работах [2, 3] при изучении модификации белкового ингибитора протеолитических ферментов (ММ 31000 Да) природными и синтетическими полимерами было высказано предположение, что, наряду с химическими свойствами используемого носителя, обеспечивающими его реакцию с белком в мягких условиях, определенный вклад в изменение активности модифицированного белка может вносить и конформация полимерной цепи носителя. Было также предположено, что повышение гибкости цепи увеличивает вероятность внутримолекулярной ассоциации связанных с ней белковых молекул, создавая тем самым стерические препятствия для их реакции с высокомолекулярным субстратом. В качестве белка был использован трипсин (КФ 3.4.21.4), который был одним из первых ферментов, изученных в иммобилизованном состоянии [4]. Выбор полиакриламида и декстрана в качестве носителей обусловлен их достаточно широким применением в медицине, биотехнологии и пищевой

промышленности [5–7]. Флуоресцентная спектроскопия была основным методом для изучения ассоциации белковых молекул.

Цель работы – синтезировать производные фермента с двумя полимерами, различающимися конформациями цепи, и найти корреляцию между строением этих производных и каталитической активностью иммобилизованного фермента по отношению к низко- и высокомолекулярным субстратам.

### МЕТОДИКА

В работе использовали акриламид, *n*-нитроанилид N- $\alpha$ -бензоил-D,L-аргинина (БАПА) и декстран с ММ 125000 Да (“Serva”, Германия), трипсин, панкреатический ингибитор трипсина (ПИТ), ингибитор трипсина из сои (СИТ), родамин-В-изотиоцианат и флуоресцеин-изотиоцианат на цеолите (“Sigma”, США), утиный овомукоид (ОМ, ММ 31000 Да) (“Белмедпрепараты”, Беларусь), сефадексы G-25 и G-100 (“Pharmacia”, Швеция). N-акрилоилгидроксифталимид (АГФИ) синтезировали по методике [8].

Родамин- (РТ) и флуоресцеинмеченный трипсин (ФТ) получали реакцией трипсина с родамин-В- или флуоресцеин-изотиоцианатом на цеолите. Раствор отфильтровывали от цеолита и отделяли от непрореагировавшего красителя на сефадексе G-25.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре F-4000 (“Hitachi”, Япония).

**Таблица 1.** Каталитическая и комплексообразующая активность иммобилизованного трипсина

Полимер	Иммобилизованный трипсин*	Активность по отношению к различным субстратам, % от активности нативного трипсина **			
		БАПА	ПИТ	СИТ	ОМ
Декстран	1–2	72–75	66–70	58–62	47–51
	3–4	74–80	59–64	61–67	45–49
	6–7	69–75	61–67	56–60	50–54
Полиакрил-амид	1–2	67–72	62–65	52–56	45–49
	4–5	70–74	44–49	40–46	34–39
	6–7	66–70	38–42	35–39	28–34

\* Количество молекул трипсина, связанных с одной молекулой полимера.

\*\* Приведены минимальные и максимальные значения 3 измерений.

Иммобилизацию трипсина на декстране проводили по методике [9]. При этом для иммобилизации была использована смесь **РТ** и **ФТ** (мольное соотношение 2 : 1). Продукты иммобилизации отделяли от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на сефадексе G-100.

Иммобилизацию аналогичной смеси **РТ** и **ФТ** на полиакриламиде осуществляли взаимодействием свободных аминогрупп молекул фермента с предварительно синтезированным активированным сополимером акриламида и АГФИ. Молекулярную массу полимеров оценивали методом вискозиметрии [10].

Амидазную активность нативного и иммобилизованного трипсина определяли, измеряя степень гидролиза БАПА по методу Какадэ [11]. Активность фермента выражали в %, принимая за 100% активность нативного фермента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения роли конформационного состояния макромолекулы полимера-носителя в проявлении активности иммобилизованным ферментом были использованы два полимера: природный полисахарид – декстран, и карбоцепной синтетический полимер – полиакриламид. В растворе макромолекула полиакриламида находится в конформации статистического клубка, в котором внутримолекулярная концентрация собственных звеньев не превышает 1 мас. %. [12]. Макромолекула декстрана имеет более плотную упаковку и форму жесткого клубка [13].

Для иммобилизации на декстране фермент предварительно окисляли перйодатом калия. Продукт окисления содержал  $51 \pm 6$  альдегидных групп, которые определяли спектрофотометрически с помощью 4-амино-3-гидразино-5-меркапто-1,2,4-триазола [14]. Взаимодействием альдегидных групп декстрана с аминогруппами трипсина и восстановлением азометиновой связи боргидридом натрия были получены и выделены производ-

ные декстрана, каждая макромолекула которого содержала в среднем от одной до семи молекул трипсина.

Иммобилизацию меченного трипсина на полиакриламиде проводили, используя сополимеры акриламида и АГФИ, имеющие молекулярную массу 104000–107000 Да. Изменением концентрации взаимодействующих соединений были получены и выделены производные, каждая молекула которых содержала в среднем от одной до шести молекул фермента.

Результаты изучения активности иммобилизованного трипсина по отношению к низко- и высокомолекулярным субстратам приведены в табл. 1. Из табл. 1 видно, что изменение природы полимерной цепи лишь в незначительной степени влияло на активность иммобилизованного трипсина по отношению к низкомолекулярному субстрату – БАПА. Так, активность трипсина, иммобилизованного на декстране, составляла 69–80% от активности нативного фермента, а трипсина, связанного с полиакриламидом – 66–74%. При этом активность фермента практически не зависела от количества его молекул, связанных с носителем. Следовательно, при иммобилизации трипсина на обоих носителях не создавалось значительных стерических препятствий для взаимодействия активных центров соседних молекул фермента с субстратом.

Иная картина наблюдалась при изучении активности иммобилизованного трипсина по отношению к высокомолекулярным соединениям. Эту активность оценивали, изучая состав комплексов трипсина с панкреатическим ингибитором (ММ 6500 Да), ингибитором из сои (ММ 21000 Да) и овомукоидом (ММ 31000 Да). Все эти ингибиторы подавляли активность трипсина путем образования комплекса с константой связывания порядка  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  [15].

Из данных табл. 1 видно, что в этом случае активность иммобилизованного трипсина опреде-

лялась природой используемого носителя и количеством связанных с ним молекул фермента. Если это количество невелико (1–2 молекулы трипсина на одну макромолекулу носителя), то активность иммобилизованного трипсина практически не зависела от природы носителя и слегка уменьшалась (с 66–70 до 45–51% от активности нативного фермента) с увеличением молекулярной массы ингибитора с 6500 до 31000 Да.

Конформационное состояние полимера носителя начало проявляться при увеличении числа связанных с полимером молекул трипсина. Активность иммобилизованного на полиакриламиде трипсина (Т-ПАА) оказалась значительно ниже, чем активность фермента, иммобилизованного на декстране (Т-Д). При этом, чем выше молекулярная масса ингибитора, тем больше была эта разница.

В предыдущих работах [1–3] было высказано предположение, что такое снижение активности может быть обусловлено белок-белковыми взаимодействиями, характерными для поведения белков в растворе, то есть внутримолекулярной ассоциацией связанных с молекулой полимера белковых глобул. Для проверки этого предположения в данной работе был использован метод флуоресцентной спектроскопии (рис. 1).

На рис. 1 приведена зависимость интенсивности флуоресценции водных растворов, полученных при смешивании ФТ и РТ (1) и при иммобилизации этой смеси на декстране (2) и полиакриламиде (3), от концентрации фермента. Видно, что интенсивность флуоресценции ФТ, иммобилизованного совместно с РТ на декстране, была несколько ниже, чем раствора смеси ФТ и РТ, то есть происходила передача части энергии с донора (Ф) на акцептор (Р). В существенно большей степени эффект понижения интенсивности флуоресценции был характерен для ФТ, иммобилизованного совместно с РТ на полиакриламиде. Эти результаты свидетельствовали о том, что при иммобилизации образовывались ассоциаты ФТ и РТ, в которых расстояние между метками оказывалось значительно меньше среднего расстояния, рассчитанного для равномерного распределения белковых глобул [16]. В наибольшей степени этот эффект наблюдался для трипсина, иммобилизованного на гибком носителе, полиакриламиде. Жесткая структура глобулы декстрана препятствовала сближению иммобилизованных на ней молекул фермента, что и обеспечивало их доступность даже для относительно высокомолекулярного ингибитора.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что конформация макромолекул полимера-носителя является одним из основных факторов, определяющих активность иммобилизованного белка по

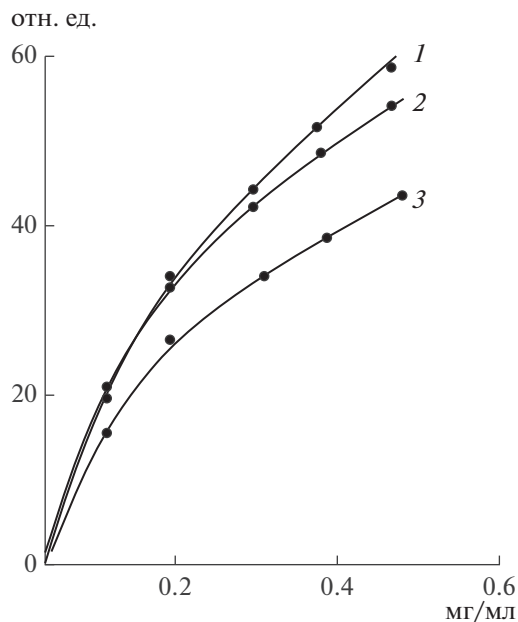


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции (отн. ед.) при 518 нм смеси ФТ и РТ (1) и ФТ и РТ, иммобилизованных на декстране (2) и на полиакриламиде (3), от концентрации фермента (соотношение ФТ и РТ – 1 : 2).

отношению к высокомолекулярным субстратам. Так, молекулы белка, иммобилизованные на гибком носителе, образовывали ассоциаты, создавая тем самым стерические препятствия для взаимодействия с высокомолекулярным субстратом. Жесткие цепи носителя предотвращали такую ассоциацию, обеспечивая доступность его активных центров для высокомолекулярных субстратов. Для низкомолекулярных субстратов такая ассоциация не являлась определяющей и молекулы белка сохраняли высокую активность после иммобилизации на носителе, как с гибкой, так и жесткой цепью. Полученные результаты открывают еще одну возможность регулирования специфичности действия ферментов путем подбора носителя с разной гибкостью полимерной цепи.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИНХС РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maiti S., Shklyayev O.E., Balazs A.C., Sen A. // *Langmuir*. 2019. V. 35. № 10. P. 3724–3732.
2. Шаназарова И.М., Ванчугова Л.В., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1992. Т. 28. № 2. С. 292–295.
3. Валуева Т.А., Валуев И.Л., Обыденнова И.В., Валуев Л.И. // *Биоорганическая химия*. 2010. Т. 36. № 6. С. 769–773.

4. *Martinek K., Goldmacher V.S., Klibanov A.M., Berezin I.V.* // FEBS Lett. 1975. V. 51. № 1. P. 152–155.
5. *Абрамов Л.И., Байдуров Т.А., Григорян Э.П., Зильберман Е.Н., Куренков В.Ф., Мягченков В.А.* Полиакриламид, М.: Химия. 1992. 192 с.
6. *Schirmer B., Rezniczek T., Seifert R., Neumann D.* // Biochem. Pharmacol. 2015. V. 98. № 1. P. 102–109.
7. *Li J., Yu S., Yao P., Jiang M.* // Langmuir. 2008. V. 24. № 7. P. 3486–3492.
8. *Назарова О.В., Соловский М.В., Панарин Е.Ф., Алексеева С.В.* // Высокомолекулярные соединения. 1989. Т. 31А. № 2. С. 387–396.
9. *Reiner R.H., Batz H.G.* // Macromol. Chem. 1981. V. 182. № 6. P. 1641–1648.
10. *Шур А.М.* Высокомолекулярные соединения. М.: Высшая школа. 1981. 657с.
11. *Kakade M.L., Simons N., Liener J.E.* // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518–526.
12. *Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я.* Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964. 719 с.
13. *Aron L.H., Fran H.P.* // J. Phys. Chem. 1954. V. 58. № 11. P. 953–957.
14. *Dickinson R.G., Jacobsen N.W.* // J. Soc. Chem. Commun. 1970. V. 64. № 5. P. 1719–1724.
15. *Мосолов В.В.* // Протеолитические ферменты. М.: Наука. 1971. 404 с.
16. *Fairclough R.H., Cantor C.R.* // Methods Enzymol. 1978. V. 48. P. 347–379.

## Conformation of Polymer-Carrier Macromolecules and Activity of Immobilized Enzyme

I. L. Valuev<sup>a,\*</sup>, L. V. Vanchugova<sup>a</sup>, and L. I. Valuev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Topchiev's Institute of petrochemical synthesis RAS, Moscow, 119991 Russia*

*\*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru*

Received February 27, 2019; revised June 22, 2019; accepted August 30, 2019

The dependence of the activity of immobilized trypsin on the conformation of the polymer carrier macromolecule was studied. Using fluorescence spectroscopy, it has been shown that immobilization of the enzyme on a rigid polymer chain prevents the association of enzyme molecules and ensures the availability of its active centers even for high-molecular-weight molecules.

*Keywords:* trypsin, immobilization, dextran, polyacrylamide

УДК 57.088.3:577.152.344

## ОЧИСТКА ПРОТЕАЗЫ – АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ПРОДУЦИРУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D

© 2020 г. С. К. Комаревцев<sup>1</sup>, Е. А. Попова<sup>1</sup>, В. Г. Крейер<sup>1</sup>,  
К. А. Мирошников<sup>2</sup>, А. А. Осмоловский<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Разработан метод очистки протеазы – активатора протеина С плазмы крови человека из культуральной жидкости микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D. Свойства этого белка близки свойствам активатора протеина С из яда змеи *Agkistrodon contortrix contortrix*, который используется в современной лабораторной диагностике протеина С. Метод представляет собой комбинацию фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии. В результате был получен высокоочищенный препарат активатора протеина С, удельная активность которого в процессе очистки возросла более чем в 350 раз.

**Ключевые слова:** активатор протеина С, хроматография, протеазы микромицетов

**DOI:** 10.31857/S0555109920010092

Протеин С – витамин-К-зависимый антикоагулянтный белок, образующийся главным образом в печени и эндотелии в форме неактивного одноцепочечного профермента. Активная форма протеина С образуется в результате ограниченного протеолиза профермента под действием комплекса тромбина с тромбомодулином и представляет собой сериновую протеазу. Функция активной формы протеина С заключается в ингибировании процесса свертывания крови за счет стимуляции фибринолиза и прерывания тромбиногенеза [1–3]. Вследствие важной физиологической роли протеина С в медицине существуют различные методы определения его функциональной активности, необходимые для диагностики ряда заболеваний системы гемостаза и их своевременной профилактики. В основе подавляющего большинства этих методов лежит использование активаторов протеина С из яда змей, чаще всего – южноамериканского медноголового щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix* [4, 5]. Ограниченная доступность ключевого компонента препятствует более широкому использованию диагностических методов в практике.

Ранее было показано, что ряд штаммов микромицета *Aspergillus ochraceus* секретирует протеазы, обладающие способностью активировать протеин С. Эти белки по ряду свойств сходны с активаторами, получаемыми из змеиного яда [6–8]. В частности, они обладают высокой тромбино- и плазминоподобной активностями и специфически расщепляют соответствующие хромогенные пептидные субстраты. Поэтому активаторы протеина С, продуцируемые микромицетами *A. ochraceus*, могут рассматриваться как потенциально более доступные аналоги активаторов из змеиного яда [9, 10].

В связи с этим становится актуальной проблема выделения и очистки активатора протеина С из культуральной жидкости *A. ochraceus*. Метод изоэлектрофокусирования, использованный для выделения активатора в ряде работ [8–10], позволяет получать небольшие количества высокоочищенного препарата, однако он трудно масштабируем и не может быть внедрен в промышленное производство. Разработанный ранее способ хроматографической очистки протеаз *A. ochraceus* основан на использовании труднодоступных носителей сочетанного действия с невысокой воспро-

изводимостью и не обеспечивает достаточной степени очистки конечного продукта [11].

Цель работы – разработка способа очистки активатора протеина С из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F4104D с использованием современных хроматографических носителей.

## МЕТОДИКА

**Продуцент и условия культивирования.** Использовали изученный ранее [8–10] штамм микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, продуцирующий протеазу-активатор протеина С. Культивирование микромицета проводили в две последовательные стадии, выращивая его на посевой (состав в %: сусло – 6.7, глюкоза – 1, пептон – 0.1, рН 5.5–6.0) и ферментационной средах (состав в %: глюкоза – 3.5, гидролизат рыбной муки – 1, NaCl – 0.2, крахмал – 0.125, пептон – 0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.05,  $\text{MgSO}_4$  – 0.05, рН 5.5–6.0). Инокулят, получаемый смыванием посевой средой спор микромицета, выращенного в течение 7 сут на скошенном сусло-агаре 3°Б, вносили в посевную среду и культивировали в течение 2 сут, после чего часть биомассы переносили в ферментационную среду и культивировали ещё 2 сут. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды, на орбитальной качалке при 200 об./мин при 28°С [12].

**Фракционирование культуральной жидкости.** После окончания культивирования мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия). Протеазу-активатор протеина С осаждали из полученного фильтрата сульфатом аммония, подбирая оптимальную для осаждения белка степень его насыщения [13, 14]. Для этого к аликватам культуральной жидкости медленно добавляли кристаллический сульфат аммония, получая различные степени насыщения: 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75 и 0.8 (за насыщенный раствор принимали 4.1 М раствор сульфата аммония, содержащий 767 г соли на 1 л), инкубировали в течение 12 ч при 4°С, после чего осадок отделяли центрифугированием при 15000 г на Роторе JA-20 (“Beckman J2-21”, Германия) в течение 20 мин. Для определения оптимальной для осаждения белка степени насыщения сульфатом аммония в супернатантах измеряли остаточную активность целевого белка.

**Гидрофобная хроматография.** Полученный при осаждении из культуральной жидкости белок, содержащий активатор протеина С, растворяли в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.0, содержащем сульфат аммония 0.35 степени насыщения, центрифугировали для удаления не растворившихся белков при 15000 г в течение 20 мин, после чего

супернатант наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-4В (“GE Healthcare”, США), уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили градиентом концентрации сульфата аммония в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.0, от степени насыщения 0.35 до 0 [15, 16].

**Ионообменная хроматография.** Полученные после гидрофобной хроматографии активные компоненты, содержащие активатор протеина С, объединяли и наносили для дальнейшей очистки на колонку с ДЭАЭ-сефарозой (“GE Healthcare”, Швеция), предварительно уравновешенной 50 мМ Трис-НСl-буфером, рН 8.0. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1.0 М в стартовом буфере [17, 18].

**Гель-фильтрация.** Обогащенные целевым белком компоненты, полученные после ионообменной хроматографии, объединяли и концентрировали центрифугированием на мембранном фильтре Millipore (“Merck”, Германия), после чего наносили для дальнейшей очистки на колонку с Сефадексом G-50 (“Pharmacia”, Швеция), уравновешенную 50 мМ Трис-НСl-буфером, рН 8.0. Элюцию проводили тем же буфером. Активные очищенные фракции, содержащие протеазу-активатор протеина С, объединяли для дальнейшего анализа [19, 20].

**Определение протеолитической активности.** Ферментативную активность активатора протеина С определяли по реакции специфического расщепления бесцветного хромогенного пептидного субстрата *n*-нитроанилида тозил-глицил-пролил-аргинина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), сопровождающегося накоплением свободного *n*-нитроанилина, окрашенного в желтый цвет. Для качественного определения активности в хроматографических фракциях, соответствующих максимумам поглощения при 280 нм, использовали дот-метод на парафильме. Для этого к 20 мкл 50 мМ Трис-НСl-буфера, рН 8.0, содержащего 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , добавляли по 20 мкл фермента и субстрата и визуально оценивали интенсивность окраски смеси против контроля, в который вместо субстрата вносили буфер [9, 10].

Количественное измерение активности проводили с использованием планшетного спектрофотометра “Wallac 1420” (“PerkinElmer”, Финляндия) при 405 нм. Реакцию проводили в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.0, содержащем 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , при 37°С. К 50 мкл раствора фермента добавляли 50 мкл раствора субстрата (0.5 мг/мл), инкубировали 1 мин в описанных выше условиях и останавливали реакцию добавлением 100 мкл 50%-ной уксусной кислоты. За единицу ферментативной активности (ед.) принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль субстрата за



**Таблица 1.** Результаты очистки активатора протеина С из культуральной жидкости *A. ochraceus*

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки, раз	Суммарная активность, ед.	Выход по активности, %
Культуральная жидкость	740	5.7	4218	0.02	1	84	100
Гидрофобная хроматография	35	0.7	24.5	2	100	49	58
Ионообменная хроматография (после концентрирования)	1	5.6	5.6	5.5	275	31	37
Гель-фильтрация	7.5	0.4	3	7.5	375	23	27

1 мин. Измерения проводили в условиях линейной зависимости скорости накопления продукта реакции от времени [21, 22].

**Анализ белкового состава компонентов.** Для определения белкового состава полученных компонентов проводили электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na (концентрация акриламида в концентрирующем геле – 6%, в разделяющем – 12.5%). В качестве маркеров молекулярных масс использовали набор “Unstained Protein Molecular Weight Marker” (“Thermo Fisher Scientific”, США). После окончания электрофореза гель окрашивали 0.1%-ным раствором Ку-масси бриллиантового голубого R-250 [23, 24]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом на приборе “NanoDrop One” (“Thermo Fisher Scientific”, США) с использованием коэффициента экстинкции 0.667 при 280 нм [25].

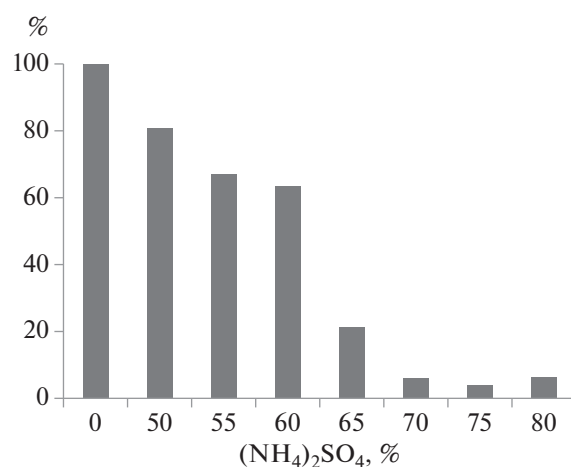
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культуральная жидкость микромицета *A. ochraceus*, полученная по окончании срока культивирования продуцента, после удаления биомассы представляла собой прозрачную жидкость коричневого цвета, содержащую остатки компонентов питательной среды и различные, в том числе окрашенные, метаболиты микромицета. Суммарная концентрация белка в культуральной жидкости составила 5.7 мг/мл, а удельная ферментативная активность активатора протеина С – 0.02 ед./мг (табл. 1). На первой стадии очистки использовали высаливание сульфатом аммония, поскольку оно является доступным способом концентрирования целевого белка из большого объема культуральной жидкости и позволяет одновременно отделить значительное количество примесей, остающихся в растворенном виде.

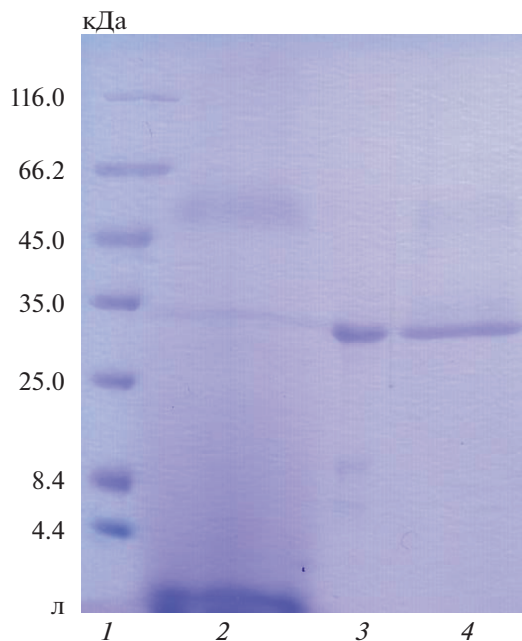
Для определения оптимальной степени насыщения сульфата аммония, необходимой для осаждения активатора протеина С, измеряли ферментативную активность в культуральной жидкости

до и после высаливания различными концентрациями сульфата аммония. На рис. 1 приведена зависимость между степенью насыщения сульфата аммония и остаточной ферментативной активностью культуральной жидкости после высаливания. Снижение остаточной активности до минимальных значений произошло в опытах со степенями насыщения сульфата аммония 0.7, 0.75 и 0.8. Следовательно, степень насыщения сульфата аммония 0.7 является оптимальной для осаждения активатора протеина С из культуральной жидкости в процессе его выделения и очистки. Использование более высоких степеней насыщения 0.75 и 0.8 было нецелесообразным, поскольку это не приводило к существенному увеличению выхода целевого белка, но повышало количество соосаждающихся с ним примесей.

Электрофоретический анализ осадка, полученного в процессе высаливания культуральной жидкости сульфатом аммония при степени насыщения 0.7, показал, что вместе с целевым белком с молекулярной массой около 33 кДа содержалось



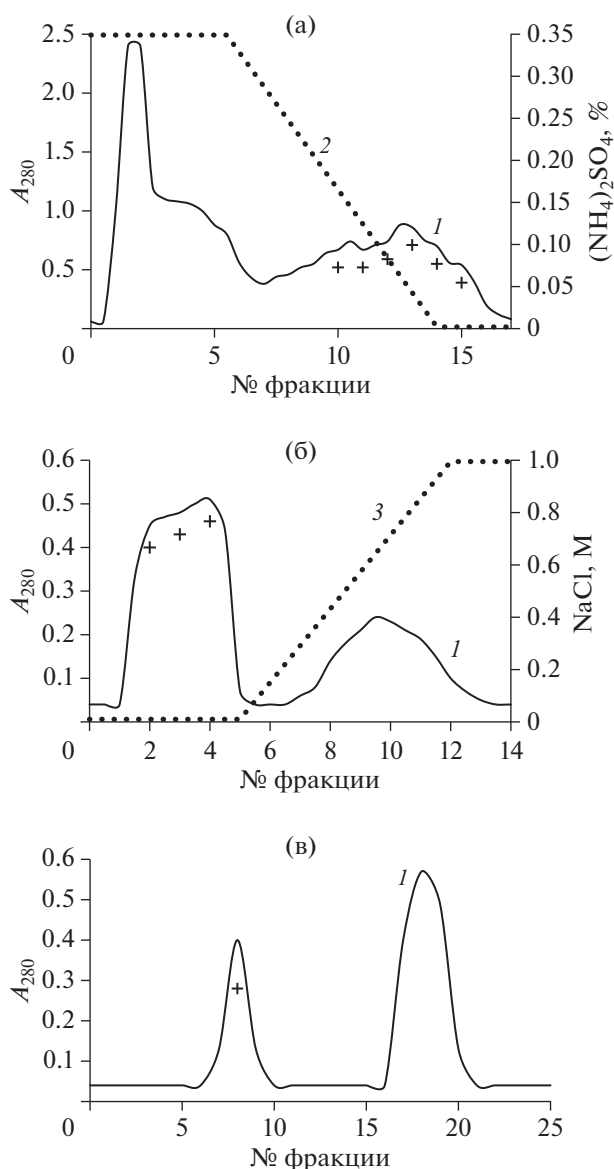
**Рис. 1.** Зависимость от степени насыщения сульфата аммония (%) остаточной ферментативной активности активатора протеина С в культуральной жидкости *A. ochraceus* (%) после высаливания.



**Рис. 2.** Результаты электрофоретического анализа белкового состава осадка после высаливания культуральной жидкости *A. ochraceus* (2), компонентов, обогащенных активатором протеина С, после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе (3), очищенной протеазы-активатора протеина С после гель-фильтрации (4). Белки-маркеры молекулярных масс (1): β-галактозидаза – 116.0, БСА – 66.2, овальбумин – 45.0, лактатдегидрогеназа – 35.0, РНКаза – 25.0, β-лактоглобулин – 18.4 и лизоцим – 14.4 кДа.

значительное количество примесей, поэтому он нуждался в дальнейшей очистке (рис. 2, дорожка 2). Визуально осадок имел насыщенный коричневый цвет из-за содержания окрашенных продуктов метаболизма микромицета. Следует отметить, что основная часть примесей также начинала осаждаться при степенях насыщения сульфата аммония 0.65–0.7. В связи с этим было сделано заключение, что проведение предварительных стадий высаливания при степенях насыщения ниже 0.65 для осаждения посторонних компонентов культуральной жидкости не является обязательным, поскольку не приводит к существенному увеличению чистоты целевого белка, получаемого на данном этапе очистки.

В дальнейшем было необходимо разработать способ очистки протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus*. В качестве следующей стадии очистки выбрали гидрофобную хроматографию на фенол-сефарозе. Ее результаты приведены на рис. 3а. Использованный хроматографический буфер, содержащий сульфат аммония 0.35 степени насыщения, обеспечил как растворение осадка протеазы-активатора протеина С,



**Рис. 3.** Результаты хроматографии компонентов, обогащенных активатором протеина С, на фенол-сефарозе (а), ДЭАЭ-сефарозе (б) и Сефадексе G-50 (в); величины оптической плотности элюата при 280 нм (1), градиенты (2) сульфата аммония (а) и (3) NaCl (б), компоненты, содержащие протеазы-активатор протеина С, отмечены "+".

так и ее хорошую сорбцию на фенол-сефарозе. В то же время значительное количество примесей в этих условиях не связалось с носителем и элюировалось со свободным объемом колонки. Целевой белок элюировался в конце снижающегося градиента сульфата аммония, что обеспечило его эффективную грубую очистку. Раствор активатора протеина С, полученный после данного этапа очистки, имел желтый оттенок, удельная актив-

ность целевого белка в нем возросла в 100 раз по сравнению с первоначальной (табл. 1).

При дальнейшей очистке с использованием ДЭАЭ-сефарозы большое количество оставшихся примесей прочно связалось с хроматографическим носителем. Из результатов хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе, приведенных на рис. 3б, видно хорошее разделение целевого белка, элюировавшегося в первых компонентах, и примесей, которые элюировались только при значительном увеличении концентрации NaCl в хроматографическом буфере. Компоненты, содержавшие активатор протеина С, после данного этапа очистки имели бледно-желтый цвет, удельная активность при этом возросла в 275 раз по отношению к исходной (табл. 1). Электрофоретический анализ полученных компонентов показал их значительное обогащение целевым белком и снижение количества примесей (рис. 2, дорожка 3).

На заключительном этапе очистки использовали гель-фильтрацию на Сефадексе G-50, предварительно сконцентрировав наносимый раствор белка на мембранном фильтре. Протеаза-активатор протеина С элюировалась с сорбента уже в начале процесса (рис. 3в), что обеспечило практически полное ее отделение от оставшихся примесей. Полученные после данного этапа очистки компоненты, содержавшие активатор протеина С, образуемого *A. ochraceus*, были бесцветны, их удельная активность возросла в 375 раз по сравнению с первоначальной (табл. 1). Электрофоретический анализ этих компонентов показал, что они содержали высокоочищенный целевой белок (рис. 2, дорожка 4).

Суммарный выход активатора протеина С после всех стадий очистки составил 27% (табл. 1), что незначительно ниже чем выход 35%, полученный при способе очистки протеазы другого штамма – *A. ochraceus* 513, и основанный на использовании бациллихин-силохрома, который был ранее опубликован в работе [11]. Однако возрастание итоговой степени очистки целевого белка в 375 раз, достигнутое при использовании предложенного в данной работе способа, значительно превышало ранее полученные результаты, в которых степень очистки возрастала только в 36 раз [11]. Это, а также труднодоступность бациллихин-силохрома в настоящее время, делают предложенный метод очистки более перспективным и легкодоступным для получения протеазы-активатора протеина С *A. ochraceus*.

Таким образом, с использованием современных хроматографических носителей была получено значительное количество высокоочищенной протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bouwens E.A., Stavenuiter F., Mosnier L.O.* // J. Thromb. Haemost. 2013. V. 11. № 1. P. 242–253.
2. *Griffin J.H., Fernandez J.A., Gale A.J., Mosnier L.O.* // J. Thromb. Haemost. 2007. V. 5. № 1. P. 73–80.
3. *Струкова С.М.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314–1331.
4. *Gempeler–Messina P.M., Müller C.* // Toxin Rev. 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
5. *Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svendsen L.* // Toxicol. 1987. V. 25. № 3. P. 239–252.
6. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 537–542.
7. Патент РФ. 2011. № 2460772.
8. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 6. С. 580–586.
9. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
10. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 373–379.
11. *Батомункуева Б.П., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
12. Патент РФ. 2011. № 2468081.
13. *Green A.A., Hughes W.L.* // Methods Enzymol. 1955. V. 1. № 10. P. 67–90.
14. *Scopes R.* Protein Purification: Principles and Practice / Ed. C.R. Cantor. N.Y.: Springer, 1993. 345 p.
15. *Kennedy R.M.* // Methods Enzymol. 1990. V. 182. № 27. P. 339–343.
16. *McCue J.T.* // Methods Enzymol. 2009. V. 463. № 25. P. 405–414.
17. *Bollag D.M.* // Methods Mol. Biol. 1994. V. 36. № 2. P. 11–22.
18. *Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F.* // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1485. № 11. P. 209–223.
19. *Stellwagen E.* // Methods Enzymol. 1990. V. 182. № 25. P. 317–328.
20. *Bollag D.M.* // Methods Mol. Biol. 1994. V. 36. № 1. P. 1–9.
21. *Lorsch J.R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 536. № 1. P. 3–15.
22. *Harris T.K., Keshwani M.M.* // Methods Enzymol. 2009. V. 463. № 7. P. 57–71.
23. *Brunelle J.L., Green R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 541. № 12. P. 151–159.
24. *Brunelle J.L., Green R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 541. № 13. P. 161–167.
25. *Noble J.E., Bailey M.J.* // Methods Enzymol. 2009. V. 463. № 8. P. 73–95.

## Purification of the Protease-Activator of Protein C of Human Blood Plasma Produced by the Micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D

S. K. Komarevtsev<sup>a</sup>, E. A. Popova<sup>a</sup>, V. G. Kreyer<sup>a</sup>, K. A. Miroshnikov<sup>b</sup>, and A. A. Osmolovskiy<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

<sup>b</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Moscow, 117997 Russia*

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

Received May 19, 2019; revised August 23, 2019; accepted August 30, 2019

A method for the purification of a protease activator of protein C of human blood plasma from the culture fluid of *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D micromycete has been developed. This protein is similar in properties to the activator of protein C from the venom of the snake *Agkistrodon contortrix contortrix*, which is used in modern laboratory diagnostics of protein C. The method is a combination of fractionation with ammonium sulfate, hydrophobic, ion-exchange and gel permeation chromatography. As a result, a highly purified protein C activator preparation was obtained, the specific activity of which during the purification process increased by more than 350 times.

*Keywords:* protein C activator, chromatography, micromycete proteases

УДК 5-77.214.622+577.27

## КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ЭТИХ БЕЛКОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ

© 2020 г. А. Н. Антипов<sup>1</sup>, Н. Н. Мордкович<sup>1</sup>, Т. В. Хижняк<sup>2</sup>, Н. А. Огорокова<sup>1</sup>, В. П. Вейко<sup>1</sup>. \*

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

<sup>2</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 14.06.2019 г.

После доработки 20.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Клонированы гены тимидинфосфорилазы (*deoA*) и пурипнуклеозидфосфорилазы (*deoD*) из экстремофильной бактерии *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3. Сконструированы экспрессионные плазмиды и получены высокоэффективные рекомбинантные штаммы – продуценты этих белков. Рекомбинантные нуклеозидфосфорилазы выделены методами ионообменной хроматографии в гомогенном состоянии, исследованы их физические и ферментативные свойства. Показано, что изучаемые тимидинфосфорилаза (HrTPP) и пурипнуклеозидфосфорилаза (HrPNP) формируют димерную и гексамерную формы, соответственно. Выявлена повышенная по отношению к тимидину (в сравнении с ее аналогом из *Escherichia coli*) удельная активность тимидинфосфорилазы из экстремофильной бактерии *H. chromatireducens* AGD 8-3.

**Ключевые слова:** тимидинфосфорилаза, пурипнуклеозидфосфорилаза, *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, ферментативный катализ

**DOI:** 10.31857/S055510992001002X

Нуклеозидфосфорилазы – семейство ферментов, катализирующих обратимое расщепление N-гликозидной связи у нуклеозидов, присутствуют в клетках практически у всех организмов и принимают участие в биосинтезе нуклеозидов. К ним относятся тимидинфосфорилаза (TPP, КФ 4.2.4), пурипнуклеозидфосфорилаза (PNP, КФ 2.4.2.1) и уридинфосфорилаза (UDP, КФ 2.4.2.3). В последние десятилетия нуклеозидфосфорилазы являются объектами пристального внимания исследователей, что определяется, по крайней мере, тремя причинами. Первая – стремление на основе исследования пространственной структуры этих белков решить фундаментальную задачу определения молекулярного механизма функционирования данного класса ферментов [1–4]. Вторая причина – возможность практического использования нуклеозидфосфорилаз в ферментативном синтезе (“зеленая химия”) аналогов нуклеозидов, находящих самое широкое применение в терапии многих заболеваний [5–10].

Не менее важным является также третий аспект, который заключается в необходимости ингибирования нуклеозидфосфорилаз при лечении различных, в том числе и онкологических, заболеваний. В настоящее время обнаружено, что эти ферменты способствуют прогрессированию злокачественных новообразований. Механизм этого процесса до конца не выяснен, но для тимидинфосфорилазы показано, что этот фермент способствует неконтролируемому ангиогенезу, вносящему существенный вклад в развитие таких заболеваний, как сердечно-сосудистые патологии, ревматоидный артрит, атеросклероз, диабетическая ретинопатия [11–13]. Указанные факты переводят, в частности, тимидинфосфорилазу, в статус несомненной мишени для воздействия на нее при терапии многих, включая и онкологические, заболеваний.

Схема противоопухолевой терапии предполагает использование антипролиферативных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов (например, 5-фторурацил). Однако высокий уровень накопления тимидин- и уридинфосфо-

рилиз в клетках злокачественных новообразований приводит к разрушению используемых соединений и резкому снижению их эффективности [14], что, в свою очередь, вызывает необходимость использования повышенных доз этих высокотоксичных соединений. Применение в этом случае специфических ингибиторов нуклеозидфосфорилаз позволяет проводить противораковую терапию в более щадящих для пациента условиях [15].

В ряду нуклеозидфосфорилаз особое внимание также уделяется пуриноклеозидфосфорилазе — важнейшему ферменту метаболизма пуринов. В настоящее время ведется активный поиск высокоспецифических и эффективных ингибиторов этого фермента, что необходимо для создания селективного Т-клеточного иммунодефицитного статуса организма при проведении трансплантации тканей и отдельных органов. Кроме того, как и другие нуклеозидфосфорилазы, этот фермент нашел свое применение в стереоселективном ферментативном синтезе модифицированных нуклеозидов [16, 17].

Все указанные аспекты (изучение структурно-функциональной организации нуклеозидфосфорилаз, использование этих ферментов в биотехнологических процессах, терапия, основанная на целевом воздействии на этот класс ферментов) инициировали получение и исследование свойств нуклеозидфосфорилаз из различных источников [18–21]. На основании этих данных высказываются как предположения о строении активных центров и причинах различия в функциональной активности этих белков, так и осуществляется подбор оптимальных ферментов для получения модифицированных нуклеозидов.

В этом ряду особое внимание уделяется нуклеозидфосфорилазам из экстремофильных, в частности термофильных, бактерий [22–25]. Интерес к термостабильным нуклеозидфосфорилазам объясняется не только вопросами оптимизации биотехнологических процессов получения модифицированных нуклеозидов (например, увеличению растворимости гетероциклических оснований, используемых в этих процессах), но и фундаментальными попытками объяснить природу устойчивости самих ферментов к термальной денатурации.

Как указано выше, сравнительно низкая растворимость многих гетероциклических оснований при нейтральных значениях рН во многом затрудняет ферментативный синтез модифицированных нуклеозидов. Одновременно с этим, сами нуклеозидфосфорилазы проявляют оптимальную активность именно при нейтральных значениях этого показателя, что приводит к дисбалансу в проводимом процессе. В связи с этим, поиск ферментов, способных осуществлять синтез производных нуклеозидов в приближенных к щелочным рН, также может существенно оптимизировать способ самого ферментативного синтеза.

Цель работы — клонировать гены нуклеозидфосфорилаз из мезофильной бактерии *H. chromatireducens* AGD 8-3 и сконструировать рекомбинантные штаммы-продуценты этих белков, а также исследовать их ферментативные свойства.

## МЕТОДИКА

В работе использовали: ДДС-Na, агарозу (Type I, Low EEO), борную кислоту, трис-основание (Трис-ОН), трис-гидрохлорид (Трис-НСl), ЭДТА — (“Sigma”, США), акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид (“Serva”, Германия), бромистый этидий, персульфат аммония, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин — “Fluka” (Швейцария), триптон “Bacto”, агар “Bacto”, дрожжевой экстракт “Bacto” (“Difco”, США), ампициллин “AppliChem” (Германия), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты “MBI Fermentas” (Литва). Ксантиноксидаза молока коровы, тимидин, инозин и диметилсульфоксид — “Sigma” (США). Неорганические соли фирмы “Merck” (Германия), реактивы квалификации х. ч. и о. с. ч. (Россия). Белковые маркеры молекулярной массы “Unstained Protein Molecular Weight Marker” фирмы “MBI Fermentas” (Литва).

Taq-полимеразу, рестрицирующие эндонуклеазы (BamHI и HindIII) и ДНК-лигазу фага T4 производства “MBI Fermentas” (Литва) использовали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

Выделение ДНК, очистку, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК, а также трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили согласно [26].

Штаммы *E. coli* JM110, C600DudpRecA- (*thi thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*) предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИГенетика”, Россия). Источником рекомбинантной тимидинфосфорилазы из *E. coli* (референс-белок) служил полученный нами ранее штамм-продуцент этого фермента [27].

В качестве реципиентного использовали сконструированный ранее бактериальный вектор pUU18 [28, 29], содержащий в своем составе промотор-операторную область гена уридинфосфорилазы из *E. coli*.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе “Eppendorf Mastercycler gradient” (“Eppendorf”, Германия) в объеме 20–25 мкл при 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP); 67 mM Трис-НСl (рН 8.3); 0.5 ед. Taq-полимеразы; 1–10 нг ДНК; 5 пмоль каждого праймера; 5% диметилсульфоксида. Режим амплификации (°С/с): 95/60 — 1 цикл; 95/10, 58/10, 72/20 — 25 циклов; 95/10, 58/10, 72/180 — 1 цикл.

**Таблица 1.** Структуры олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе\*

Название	5'-3'	Ген
C-tpp	TGCCGA <b>AAGCTTT</b> CGAGTACCA <b>G</b> TACGAT	<i>deoA</i>
N-str	TGGAGGGATCCTGATGCGTTCTCAAG	<i>deoA</i>
C_str	AGTCGCCGGA <b>AAGCTTT</b> CGATGGTCCGA	<i>deoD</i>
N_str	TTTTCCGGATCCATGGCGACTCCCCATAT	<i>deoD</i>

\* Жирным шрифтом выделены вводимые сайты рестрикции (BamHI и HindIII).

В качестве матричной использовали геномную ДНК, выделенную из биомассы клеток *H. chromatireducens* AGD 8-3 [30] с применением коммерческого набора “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли с использованием автоматического синтезатора ASM-800 (“Биоссет”, Россия) и очищали согласно [31].

Выделение плазмид проводили с использованием набора “GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit” производства “MBI Fermentas” (Литва). Клетки *E. coli*, содержащие плазмиду, культивировали в течение 16–18 ч в стеклянных пробирках (или колбах) со средой LB (ампициллин – 150 мкг/мл) при 37°C и 250 об./мин в шейкере-инкубаторе “Excella E25” (“New Brunswick Scientific”, США).

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [32] с окраской реагентом “Bio-Rad Protein Assay” (“Bio-Rad”, США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США).

Электрофоретическое разделение белков проводили по Леммли [33].

Ферментативную активность рекомбинантных тимидинфосфорилазы (HrTPP) и пуридиннуклеозидфосфорилазы (HrPNP) определяли в K<sup>+</sup>-фосфатном буфере согласно [34, 35] соответственно.

Определение четвертичной структуры рекомбинантных HrTPP и HrPNP проводили методом аналитической гель-фильтрации на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 с использованием прибора АКТА FPLC (“GE Healthcare”, Великобритания) в 10 mM Na<sup>+</sup>-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 150 mM NaCl. Регистрацию осуществляли при длине волны 280 нм. Объем образца – 100 мкл, скорость элюции – 1 мл/мин. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания), а также рекомбинантные тимидин- и уридинфосфорилазу из *E. coli*.

Выделение и очистку рекомбинантных тимидин- и пуридиннуклеозидфосфорилазы проводили, как описано нами ранее для уридинфосфорилазы [36].

Первичную структуру выделенных рекомбинантных белков подтверждали методом MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрического анализа их триптических гидролизатов.

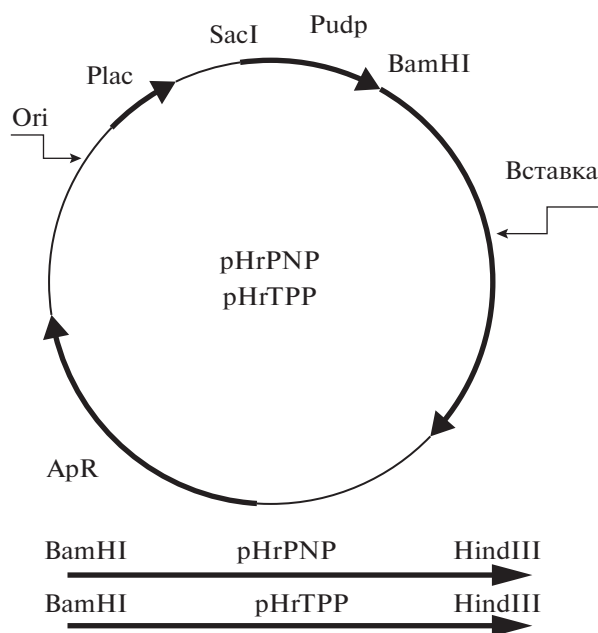
Статистическую обработку результатов серии измерений проводили с использованием программы StatPlus2007 (<http://analystsoft.com>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе в качестве экстремофильного микроорганизма нами была выбрана гетеротрофная галоалкалофильная бактерия *H. chromatireducens* AGD 8-3, выделенная из солончаков Кулундинской степи (Россия) [30, 37]. Бактерии способны к росту при высоких значениях солености (2.5 M NaCl) в щелочных условиях при pH 9.5–10.1, что позволяет отнести ее к экстремофилам. Ареал обитания бактерии предполагает наличие у нее особых систем адаптации к суммарному стрессу. Способность к росту в экстремальных условиях предполагает также присутствие в клетках ферментов с измененными свойствами, в том числе и нуклеозидфосфорилаз. Поиск таких белков инициировал клонирование генов тимидин- и пуридиннуклеозидфосфорилаз из данного экстремофила, конструирование соответствующих рекомбинантных штаммов-производителей этих белков и исследование их свойств.

В настоящее время геном *H. chromatireducens* AGD 8-3 раскрыт [38] и доступен в базе данных (GeneBank: NZ\_CP014226.1), что позволило провести планирование структур олигодезоксирибонуклеотидных праймеров (табл. 1) для амплификации и клонирования участков ДНК, кодирующих структурную часть соответствующих генов.

Важно отметить, что при проведении амплификации интересующих фрагментов ДНК из генома *H. chromatireducens* AGD 8-3 необходимо использовать диметилсульфоксид, в качестве дополнительного (на фоне температурного) фактора денатурации геномной ДНК. В ходе экспериментальной работы было обнаружено, что наиболее эффективно амплификация целевых фрагментов осуществляется в присутствии в реакционной смеси 5% диметилсульфоксида. Этот факт нами был объяснен высоким G/C-составом ДНК из *H. chromatireducens* AGD 8-3 (62.8%). Полученные фрагменты бы-

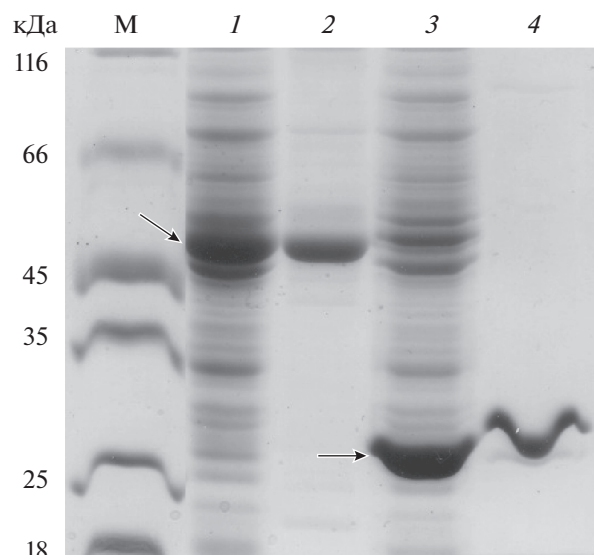


**Рис. 1.** Общая схема экспрессионных плазмид (pHrPNP и pHrTPP). Pudp – промотор-операторная область гена уридинфосфорилазы из *E. coli*. Вставка – структурная часть генов тимидинфосфорилазы или пуридинуклеозидфосфорилазы из *H. chromatireducens* AGD 8-3.

ли выделены, очищены и клонированы по сайтам BamHI-HindIII в составе экспрессионного вектора pUU18 под контроль промотор-операторной области гена уридинфосфорилазы *E. coli*. Соответствие первичной структуры клонированных фрагментов запланированной подтверждали секвенированием. Сконструированные рекомбинантные экспрессионные плазмиды были обозначены pHrTPP и pHrPNP (рис. 1).

Экспрессионными векторами (pHrPNP и pHrTPP) трансформировали реципиентный штамм *E. coli* С600 Dudp и анализировали уровень накопления рекомбинантных белков. Полученные результаты (рис. 2) свидетельствуют о том, что рекомбинантные нуклеозидфосфорилазы накапливались в растворимой фракции клеток штаммов-продуцентов. Эти данные также указывают на то, что промотор-операторная область гена *udp* из *E. coli* способна осуществлять высокоэффективную транскрипцию гибридных генов (*deoA* и *deoD* из *H. chromatireducens* AGD 8-3) в условиях гетерологичной экспрессии.

Были также проведены отдельные эксперименты по клонированию полноразмерных генов *deoA* и *deoD* из *H. chromatireducens* AGD 8-3. Однако сконструированные экспрессионные векторы, в составе которых структурные части генов исследуемых нуклеозидфосфорилаз находились под контролем нативных промотор-операторных областей, практически не приводили к накоплению



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ рекомбинантных белков в клетках *E. coli* С600 в 12.5% ПААГ с ДСН-Na. М – маркеры молекулярной массы белков. 1, 3 – белки растворимых фракций, полученных после разрушения ультразвуком клеток-трансформантов *E. coli* С600. 2, 4 – очищенные рекомбинантные (тимидинфосфорилаза) (HrTPP) и (пуридинуклеозидфосфорилаза) (HrPNP) соответственно. Рекомбинантные белки обозначены стрелками.

целевых ферментов в клетках *E. coli* (данные не приводятся). Этот факт следует отнести к существенному различию в функционировании промоторных областей в *E. coli* [39] и *H. chromatireducens* AGD 8-3, что может быть предметом отдельного исследования.

Рекомбинантные белки были выделены и очищены также, как в работе [36], с использованием ионообменной хроматографии (рис. 2), проведено изучение их ферментативных и физико-химических свойств. Первичную структуру ферментов подтверждали методом MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрического анализа их триптических гидролизатов.

Нуклеозидфосфорилазы из различных организмов отличаются топологией третичной и четвертичной структур, а также специфичностью по отношению к субстратам (нуклеозидам), что позволило их разделить на два семейства: NP-I и NP-II. Семейство NP-I обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к пури- и пиримидиннуклеозидам, в то время как NP-II проявляют избирательную активность по отношению 2'-дезоксирибонуклеозидам (например, тимидинфосфорилаза) [34, 40–42].

Четвертичные формы новых рекомбинантных пури- и пиримидиннуклеозидфосфорилаз из *H. chromatireducens* AGD 8-3 исследовали с применением аналитической гель-фильтрации на ко-



**Таблица 2.** Сравнительные характеристики тимидин- и пурииннуклеозидфосфорилаз из *E. coli* и *H. chromatireducens* AGD 8-3

Фермент	Удельная активность, ед./мг	$T_{\text{опт}}$ , °C	pH <sub>опт</sub>	Четвертичная структура	Ссылка
ETPP	105.3 ± 5.1	51.3 ± 1.6	6.6–7.3	Димер	Данная работа
HrTPP	235.2 ± 7.6	60.4 ± 1.3	7.2–8.9	Димер	Данная работа
EPNP	66.0	60.0	7.1–7.5	Гексамер	[18]
HrPNP	28.6 ± 3.8	55.2 ± 1.7	7.0–9.1	Гексамер	Данная работа

Примечание. ETPP и HrTPP; EPNP и HrPNP – тимидинфосфорилазы и пурииннуклеозидфосфорилазы из *E. coli* и *H. chromatireducens* AGD 8-3, соответственно. В качестве субстрата для ETPP и HrTPP использовали тимидин, активность HrPNP определяли с применением инозина.

лонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200. Полученные результаты показали, что рекомбинантные тимидин- и пурииннуклеозидфосфорилазы формируют димерную и гексамерную четвертичные структуры, соответственно (табл. 2.). Показано, что тимидинфосфорилаза из *H. chromatireducens* AGD 8-3 проявляла активность только по отношению к 2'-дезоксирибонуклеозидам, что позволяет отнести ее к NP-II семейству нуклеозидфосфорилаз.

Сравнительное исследование полученных рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз из *H. chromatireducens* AGD 8-3 и *E. coli* показало (табл. 2), что тимидинфосфорилаза проявляла более высокую, по сравнению с ее аналогом из *E. coli*, ферментативную активность, в то время как пурииннуклеозидфосфорилаза уступала по этому показателю референс-белку. Обращает на себя внимание и широкий диапазон значений pH, при которых оба выделенных рекомбинантных белка сохраняли свою ферментативную активность (табл. 2). Этот факт, вероятно, является отражением структурных изменений этих белков, как ответ на условия обитания самого микроорганизма (pH 9.5–10.1).

Однако сравнительное исследование влияния концентрации NaCl на активность тимидинфосфорилаз из *H. chromatireducens* AGD 8-3 и *E. coli* показало неожиданный результат. Несмотря на адаптацию клеток *H. chromatireducens* AGD 8-3 к экстремальным солевым условиям обитания, толерантность HrTPP из этого организма к данному показателю оказалась значительно ниже по сравнению с аналогичным ферментом из *E. coli* (табл. 3). Инактивация HrTPP при 2.0 М концентрации NaCl достигала 50%, а тимидинфосфорилаза из *E. coli* сохраняла 88% своей активности.

Полученные результаты выявили необходимость дополнительного сравнительного анализа первичных структур тимидинфосфорилаз из *E. coli* и *H. chromatireducens* AGD 8-3 (рис. 3).

Анализ проводили с использованием алгоритма, заложенного в работе [44], и определяющего вероятность замены аминокислотных остатков в составе родственных белков в ходе эволюции. Обращает на себя внимание тот факт, что все

аминокислотные остатки, принимающие участие при формировании фермент-субстратного комплекса для этих двух белков, остаются неизменными (рис. 3), хотя уровень гомологии исследуемых белковых структур невысок и составляет только 58.9%. Кроме того, в составе тимидинфосфорилазы из *H. chromatireducens* AGD 8-3 выявлялся дополнительный гидрофильный участок полипептидной цепи, расположенный между двумя  $\alpha$ -спиралями (251–256 и 270–287 аминокислотные остатки, нумерация по ферменту из *E. coli*). Дальнейшее выяснение особенностей строения полученных ферментов, а также роли отмеченных различий в первичной структуре и возможного их влияния на ферментативные и физико-химические свойства полученных тимидин- и пурииннуклеозидфосфорилаз из *H. chromatireducens* AGD 8-3 в настоящее время проводится с использованием рентгеноструктурного анализа.

Таким образом, в результате проведенного исследования получены рекомбинантные штаммы новых нуклеозидфосфорилаз из экстремофильной бактерии *H. chromatireducens* AGD 8-3. Исследованы основные свойства этих белков и показано, что они могут быть использованы при ферментативном синтезе производных нуклеозидов, а также для дальнейшего изучения молекулярных основ функционирования этого класса ферментов.

**Таблица 3.** Влияние концентрации NaCl на активность рекомбинантной тимидинфосфорилазы

№	NaCl, М	Активность тимидинфосфорилазы, %	
		<i>H. chromatireducens</i> AGD 8-3	<i>E. coli</i>
1	0	100.0	100.0
2	0.5	96.2 ± 2.1	98.3 ± 1.6
3	1.0	82.6 ± 1.6	95.4 ± 1.9
4	1.5	66.9 ± 2.1	94.3 ± 1.1
5	2.0	48.9 ± 1.7	88.1 ± 1.6
6	2.5	35.1 ± 1.5	82.5 ± 1.7

EC	1	M---FL <b>AQ</b> EIIRKKR <b>D</b> GHALS <b>D</b> E <b>E</b> IRFFINGIRDNTI <b>S</b> EGQIAALAMT <b>I</b> FFHDM <b>T</b> MPERV
HR	1	MrsqaLPQELIRaKRDGeALSpGaIRelVeGIIsDgSLSDaQVGVGALAMAI <b>F</b> lNgMnaGe <b>T</b> V
EC	58	<b>S</b> LT <b>M</b> AMRDSGT <b>V</b> LDW <b>K</b> SLHLNG <b>P</b> IVDK <b>H</b> STGGVGD <b>V</b> T <b>S</b> L <b>M</b> L <b>G</b> PM <b>V</b> AA <b>C</b> GGY <b>I</b> PM <b>S</b> GRGL
HR	61	AL <b>T</b> eAVRDSGeVLaWsdLDqpGPVLDKHSTGGVGD <b>L</b> vSLVLGPwVAACGGFVPMV <b>S</b> GRGL
EC	118	GHTG <b>G</b> TLD <b>K</b> LESIPGFDFIPDDNRFRE <b>I</b> IKD <b>V</b> G <b>V</b> AIIGQTSS <b>L</b> AP <b>A</b> DKRFY <b>A</b> TRDITAT <b>V</b>
HR	121	GHTGGTLDKLEAIPGYDIaPsraRFRrLVReaGVAIVGQ <b>T</b> AeLAPADK <b>R</b> LYAvRDa <b>T</b> AT <b>V</b>
EC	178	d <b>S</b> I <b>P</b> L <b>I</b> t <b>A</b> S <b>I</b> L <b>A</b> KK <b>L</b> AeGL <b>D</b> AL <b>V</b> MD <b>V</b> K <b>V</b> GS <b>G</b> AF <b>M</b> PT <b>T</b> y <b>E</b> l <b>S</b> ea <b>L</b> A <b>E</b> A <b>I</b> v <b>G</b> Ang <b>A</b> G <b>v</b> r <b>T</b> T <b>A</b>
HR	181	eSLPLIvSSILGK <b>K</b> LAcGLDALVMDV <b>K</b> sG <b>S</b> GAF <b>M</b> PT <b>p</b> EkSreL <b>A</b> E <b>A</b> IaeVAsr <b>A</b> G <b>t</b> p <b>T</b> T <b>A</b>
EC	238	<b>L</b> L <b>T</b> DMNQVLASSAG <b>N</b> AVEV <b>R</b> E <b>A</b> V <b>Q</b> FL <b>T</b> GEYR-- <b>N</b> P----- <b>R</b> L <b>F</b> D <b>V</b> T <b>M</b> AL <b>C</b> VE <b>M</b> L <b>I</b> S <b>G</b> KL
HR	241	LLTDMsQpLAPcAGNAVEV <b>R</b> E <b>A</b> Ia <b>L</b> L <b>T</b> GE <b>k</b> R <b>g</b> ee <b>S</b> g <b>e</b> kt <b>d</b> g <b>R</b> L <b>l</b> e <b>V</b> Tr <b>T</b> Laa <b>E</b> LL <b>L</b> AG <b>K</b> L
EC	290	<b>A</b> K <b>D</b> DA <b>E</b> AR <b>A</b> KL <b>Q</b> AV <b>L</b> D <b>N</b> G <b>K</b> AA <b>E</b> V <b>F</b> GR <b>M</b> V <b>A</b> AA <b>Q</b> K <b>G</b> PTDFVEN <b>Y</b> AK <b>Y</b> L <b>P</b> TAM <b>L</b> T <b>K</b> AV <b>Y</b> AD <b>T</b> E <b>G</b>
HR	301	AesrSaAvAlLddrLasGaAAErFGRMVAGlgGPADlLErrdRYLPqApIvRPVhAerc <b>G</b>
EC	350	FV <b>S</b> EM <b>D</b> TRAL <b>G</b> MA <b>V</b> VAMGGGRRQASDTIDYSV <b>G</b> FT <b>D</b> MA <b>R</b> LGDQVDGQ <b>R</b> PL <b>A</b> V <b>I</b> HAK <b>D</b> EN <b>N</b>
HR	361	rITrMDTRAVGLAVVALGGGRRaPGDAIDhAVGlTgIAaLGeaVDGERPLAwVHARsEa <b>D</b>
EC	410	<b>W</b> Q <b>E</b> AA <b>K</b> AV <b>K</b> AA <b>I</b> KLADKA-PE <b>S</b> T- <b>P</b> <b>T</b> V <b>Y</b> RR <b>I</b> S <b>E</b> ----
HR	421	aErAAaqLKAAIeVnDvGlGdvTlPTLiqhVirreap

**Рис. 3.** Сравнение первичных структур тимидинфосфорилазы (TPP) из *E. coli* (EC) и *H. chromatireducens* AGD 8-3 (HR). Выделение элементов вторичных структур белков: жирный шрифт –  $\alpha$ -спиральные структуры, а жирный курсив –  $\beta$ -структуры, согласно работе [43]. Подчеркнуты аминокислотные остатки, входящие в состав фермент-субстратного комплекса в тимидинфосфорилазе из *E. coli* [34].

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

Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ (Грант № 18-04-00784 А).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pugmire M.J., Cook W.J., Jasanoff A., Walter M.R., Ealick S.E. // J. Mol. Biol. 1998. V. 281. № 2. P. 285–299.
2. Caradoc–Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont I.L., Cutfield J.F. // J. Mol. Biol. 2004. V. 337. № 2. P. 337–354.
3. Safonova T.N., Mordkovich N.N., Veiko V.P., Okorokova N.A., Manuvera V.A., Dorovatovskii P.V., Popov V.O., Polyakov K.M. // Acta Crystallogr. D. Struct. Biol. 2016. V. 72. № 2. P. 203–210.
4. Mordkovich N.N., Safonova T.N., Antipov A.N., Manuvera V.A., Polyakov K.M., Okorokova N.A., Veiko V.P. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 1. P. 12–20.
5. Константинова И.Д., Леонтьева Н.А., Галегов Г.А., Рыжова О.И., Чувииковский Д.В., Антонов К.В., Есипов Р.С., Таран С.А., Веревкина К.Н., Феофанов С.А., Мирошников А.И. // Биоорг. химия. 2004. Т. 30. № 6. С. 613–620.
6. Utagawa T. // J. Molec. Cat. B: Enzymatic. 1999. V. 6. P. 215–222.
7. Komatsu H., Araki T. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2005. V. 24. № 5–7. P. 1127–1130.
8. Roivainen J., Elizarova T., Lapinjoki S., Mikhailopulo I.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2007. V. 26. № 8–9. P. 905–909.
9. Михайлопуло И.А., Мирошников А.И. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 2. С. 38–61.
10. Mahmoud S., Hasabelnaby S., Hammad S.F., Sakr T.M. // J. Advanced Pharmacy Reseach. 2018. V. 2. № 2. P. 73–88.
11. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. // Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. № 3. P. 253–270.
12. Carmeliet P. // Nature. 2005. V. 438. № 7070. P. 932–936.
13. Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M., Kawahara K., Shinsato Y., Minami K., Shimokawa M., Akiyama S. // Pharmacological Research. 2018. V. 132. P. 15–20.
14. Ashour O.M., Naguib F.N.M., Khalifa M.M.A., Abdel-Raheem M.H., Panzica R.P., el Kouni M.H. // Cancer Res. 1995. V. 55. № 5. P. 1092–1098
15. Iigo M., Nishikata K., Nakajima Y., Szinai I., Veres Z., Szabolcs A., De Clercq E. // Biochem. Pharmacol. 1990. V. 39. № 7. P. 1247–1253
16. Погосян Л.Г., Акоюн Ж.И. // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59. № 5. С. 483–497.
17. Погосян Л.Г., Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Мкртчян З.С., Меликсетян Г.О., Акоюн Ж.И. // Укр. биохим. журн. 2008. Т. 80. № 5. С. 95–104.
18. Jensen K.F., Nygaard P. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 51. № 1. P. 253–265.
19. Xie X., Xia J. He K., Lu L., Xu Q., Chen N. // Biotechnol. Lett. 2011. V. 33. № 6. P. 1107–1112.

20. Visser D.F., Hennessy F., Rashamuse K., Louw M.E., Brady D. // *Extremophiles*. 2010. V. 14. № 2. P. 185–192.
21. Xie X., Huo W., Xia J., Xu Q., Chen N. // *Enzyme Microb. Technol.* 2012. V. 51. № 1. P. 59–65.
22. Liu K., Zhou Y., Zhang J., Chu J., Zhang Y., He B. // *Biotechnol Lett.* 2017. V. 39. № 12. P. 1903–1910.
23. Zhou X., Szeker K., Janocha B., Böhme T., Albrecht D., Mikhailopulo I.A., Neubauer P. // *FEBS J.* 2013. V. 280. № 6. P. 1475–1490.
24. Almendros M., Gago J.V., Carlos J.B. // *Molecules*. 2009. V. 14. № 3. P. 1279–1287.
25. Szeker K., Zhou X., Schwab T., Casanueva A., Cowan D., Mikhailopulo I.A., Neubauer P. // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2012. V. 84. P. 27–34.
26. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
27. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. // *Биотехнология*. 1994. № 4. С. 2–4.
28. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. // *Докл. РАН*. 1994. Т. 339. № 6. С. 819–821
29. Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Букленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревщицова Е.Б., Дебабов В.Г. // *Биоорг. химия*. 1995. Т. 21. № 5. С. 354–358.
30. Шаповалова А.А., Хижняк Т.В., Турова Т.П., Сорочкин Д.Ю. // *Микробиология*. 2009. Т. 78. № 1. С. 117–127.
31. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // *Биоорг. химия*. 1991. Т. 17. № 5. С. 685–689.
32. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 2. P. 248–254.
33. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
34. Панова Н.Г., Алексеев К.С., Кузьмичев А.С., Щевелёва Е.В., Гаврюшов С.А., Поляков К.М., Крицын А.М., Михайлов С.Н., Есинов П.С., Мирошников А.И. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. № 1. С. 27–35.
35. Xie X., Xia J., He K., Lu L., Xu Q., Chen N. // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. № 6. P. 1107–1112.
36. Мордкович Н.Н., Манувера В.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. // *Биотехнология*. 2012. № 1. С. 21–30.
37. Shapovalova A.A., Khijniak T.V., Tourova T.P., G. Muzyzer G., Sorokin D.Y. // *Extremophiles*. 2008. V. 12. № 5. P. 619–625.
38. Sharko F.S., Shapovalova A.A., Tsygankova S.V., Komova A.V., Boulygina E.S., Teslyuk A.B., Gotovtsev P.M., Namsaraev Z.B., Khijniak T.V., Nedoluzhko A.V., Vasilov R.G. // *Genome Announcements*. 2016. V. 4. № 2. P. 1–2.
39. Овчарова И.В., Еремина С.Ю., Миронов А.С. // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 1. С. 15–25.
40. Pugmire M.J., Ealick S.E. // *Biochem J.* 2002. V. 361. № 1. P. 1–25.
41. Mushegian A.R., Koonin E.V. // *Protein Sci.* 1994. V. 3. № 7. P. 1081–1088.
42. Mahor D., Priyanka A., Prasad G.S., Thakur K.G. // *PLOS One*. 2016. V. 11. № 10. e0164279.
43. Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B., Short S.A., Koszalka G.W., Krenitsky T.A., Ealick S.E. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 23. P. 14016–14022.
44. Dayhoff, M.O. *Atlas of Protein Sequence and Structure*: National Biomedical Research Foundation. / Ed. M.O. Dayhoff. MD.: Silver Spring, 1972.

## Cloning of Nucleoside Phosphorylase Genes from the Extremophilic Bacterium *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, Constructing Recombinant Strains-Producers of These Proteins and Studying Their Enzymatic Properties

A. N. Antipov<sup>a</sup>, N. N. Mordkovich<sup>a</sup>, T. V. Khijniak<sup>b</sup>, N. A. Okorokova<sup>a</sup>, and V. P. Veiko<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

<sup>b</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamental Bases of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

\*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Received June 14, 2019; revised August 20, 2019; accepted August 30, 2019

Thymidine phosphorylase (*deoA*) and purine nucleoside phosphorylase (*deoD*) genes from the extremophilic bacterium *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3 have been cloned. Expression plasmids were constructed and highly efficient recombinant strains-producers of these proteins were obtained. Recombinant nucleoside phosphorylases were isolated by ion-exchange chromatography in a homogeneous state and their physical and enzymatic properties were investigated. It was shown that the studied thymidine phosphorylase (HrTPP) and purine nucleoside phosphorylase (HrPNP) form the dimeric and hexameric forms, respectively. Revealed increased relative to thymidine (in comparison with its counterpart from *E. coli*) specific activity of HrTPP from extremophilic bacterium *H. chromatireducens* AGD 8-3.

**Keywords:** *Halomonas chromatireducens* AGD 8-3, thymidine phosphorylase, purine nucleoside phosphorylase, enzymatic catalysis

УДК 577.112.083

## СКРИНИНГ УСЛОВИЙ РЕФОЛДИНГА И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИСТАФИЛОКОККОВОГО ЭНДОЛИЗИНА LysK<sub>CA</sub> В АКТИВНОЙ ФОРМЕ ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E. coli*

© 2020 г. А. В. Жидецкий<sup>1</sup>, \*, С. Г. Голенченко<sup>1</sup>, В. А. Прокулевич<sup>1</sup>, М. В. Шолух<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск, 220030 Беларусь

\*e-mail: Zhydzetski@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2019 г.

После доработки 29.07.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Предложен пошаговый скрининг основных характеристик рефолдинг-буфера, с использованием которого из телец включения *E. coli* получен в активной форме рекомбинантный антистафилококковый эндолизин LysK, содержащий два каталитических домена – СНАР и амидазу-2. Определены оптимальные значения pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала рефолдинг-буфера и установлены оптимальные конечные концентрации белка, мочевины и типа антиагрегационного соединения. Выяснен состав системы ренатурации антистафилококкового эндолизина, который при 10°C и разведении целевого белка до конечной концентрации 150 мкг/мл содержал 20 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7.4, содержащего 2.5 мМ ДТТ и 0.4 М сахарозы. Выход рефолдинга после масштабирования составил  $29.5 \pm 6.7\%$ , что позволило получить  $16 \pm 2.3$  мг целевого белка из 2.25 г отмытых телец включения с ферментативной активностью  $1.8 \pm 0.73 \times 10^3$  МЕ/мг.

**Ключевые слова:** рекомбинантный эндолизин LysK<sub>CA</sub>, рефолдинг белков, тельца включения, скрининг условий ренатурации

**DOI:** 10.31857/S055510992001016X

Технология рекомбинантных молекул ДНК открыла новую эру получения различного рода белков как для структурных и биохимических исследований, так и для промышленных и коммерческих целей [1]. Экспрессия в трансформированных клетках позволяет получить редкие, ценные, дорогостоящие и трудно получаемые традиционными методами белки [2, 3]. В частности, с помощью данного метода можно получить ряд терапевтических белков, которые обладают большим потенциалом для применения в медицине и ветеринарии, и которые приходят на замену стандартным методам лечения [4, 5].

Одним из таких белков является эндолизин фага К (LysK) – пептидогликангидролаза, которая участвует в лизисе грамм-положительных бактериальных клеток рода *Staphylococcus* и экспрессируется на терминальном цикле выхода зрелых фаговых частиц из клеток-хозяев [6–8]. Эндолизин LysK состоит из трех доменов – двух каталитических (СНАР и амидаза-2), и одного структурного (SH3b), причем активностью обладают и укороченные варианты данного белка, содержащие СНАР-домен [9, 10]. Высокая антистафилококковая эффективность LysK и его производных при действии на клетки рода *Staph-*

*yllococcus* делает его перспективным кандидатом на роль нового антимикробного агента в медицине и ветеринарии, особенно по отношению к штаммам, устойчивым к антибиотикам. Следует отметить, что данный белок обладает рядом преимуществ перед стандартными антистафилококковыми препаратами, главными из которых являются отсутствие развития к нему резистентности, проявление высокой видовой специфичности, отсутствие воздействия на нормальную микрофлору, а также возможность безопасного применения в пищевой промышленности [8, 11].

Вместе с тем определенные затруднения в изучении и дальнейшем применении LysK и его форм связаны с их выделением в ограниченных количествах. Работы, посвященные данному белку, основаны в большинстве случаев на его получении в штаммах-продуцентах в растворимой форме с дальнейшей очисткой на аффинных сорбентах [7, 8, 12, 13]. Однако при использовании такой технологии удается получить небольшое количество белка для исследовательских целей. В частности, в недавних работах удалось получить лишь 2–10 мг СНАР<sub>К</sub> и около 12 мг LysK<sub>CA</sub> с 1 л ферментируемой культуры [13–15]. В то же время потенциальное применение в ветеринарии, ме-

дицине и других отраслях народного хозяйства будет требовать больших количеств и соответственно более дешевых и эффективных методов получения данного белка [11].

Проблему достаточного количества целевого белка можно решить путем его получения из телец включения (ТВ) — плотных, сильно гидратированных образований, состоящих по большей части из неактивных агрегированных молекул целевого белка [16]. Хотя в данном случае возникает ряд дополнительных трудностей, главной из которых является активация молекул целевого белка, связанная с проведением процесса рефолдинга. Эффективность ренатурации рекомбинантных белков зависит от конкуренции между правильным фолдингом и агрегацией [17, 18]. Какой процесс будет доминировать, определяется составом и свойствами рефолдинг-буфера, правильный подбор которого является ключевым фактором в достижении эффективной ренатурации. К физическим параметрам буфера относятся pH, ионная сила, температура, окислительно-восстановительный потенциал среды и время, требуемое для полного принятия молекулой белка нативной конформации [18]. Помимо этого существенный эффект на процесс ренатурации оказывают конечная концентрация белка и денатуранта, а также его химический состав — присутствие антиагрегационных соединений [19–21].

Цель работы — разработать методический подход на основе скрининга условий рефолдинга LysK<sub>CA</sub> из ТВ *Escherichia coli*, позволяющий получить данный белок в активной форме.

## МЕТОДИКА

В работе использовали ТВ, содержащие рекомбинантный эндолизин K, состоявший из SHAP и амидазного домена (LysK<sub>CA</sub>), выделенные из клеток *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL pET24b LysK528+ по методике, описанной ранее [22].

**Получение LysK<sub>CA</sub> для скрининга условий рефолдинга.** Полученные ТВ (1 г) отмывали в 20 мл в раствора 50 мМ трис-буфера, содержащего 50 мМ NaCl, до полного выхода примесных соединений. Отмытые ТВ солиобилизовали в растворе 50 мМ трис-HCl буфера, pH 10, содержащего 6 М мочевины и 10 мМ β-меркаптоэтанол, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 2–3 ч. Для удаления не растворившихся частиц полученный солиобилизат центрифугировали при 8000 г в течение 30 мин при 20°C. Осветленный солиобилизат наносили на колонку с DE-сефарозой (35 мл) (“GE Healthcare”, Швеция). Не связавшуюся фракцию (проскок), содержащую целевой белок, наносили на колонку с SP-сефарозой (35 мл). Для уравнивания

и промывки колонок использовали солиобилизирующий буфер. Изократическую элюцию с SP-сефарозы проводили тем же буфером, содержащим 1.0 М NaCl. Полученный элюат использовали для скрининга условий ренатурации.

Финальную очистку и сбор целевого белка после масштабирования рефолдинга проводили на колонке с SP-сефарозой (35 мл) (“GE Healthcare”, Швеция). Для этого ее уравнивали буфером А<sub>1</sub> (20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.4, NaФБ) и промывали тем же буфером после нанесения белка. Примесные белки удаляли буфером Б<sub>1</sub>, который содержал 20 мМ NaФБ, pH 7.4, с 0.27 М NaCl. Целевой продукт элюировали градиентом 0 → 100% буферов Б<sub>1</sub> → Б<sub>2</sub> (объемом 350 мл), Б<sub>2</sub> состоял из буфера А<sub>1</sub> с 1.0 М NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, фильтровали через фильтр (0.2 мкм) и хранили при 4°C. Рассчитывали выход и специфическую ферментативную активность полученного препарата белка.

**Скрининг условий рефолдинга методом разведения.** Для определения условий рефолдинга LysK<sub>CA</sub> использовали фракцию, элюированную с SP-сефарозы, содержащую 1.8 мг белка/мл. Полученную фракцию разводили в 12 раз до конечной концентрации белка 150 мкг/мл в различных рефолдинг системах. Конечный объем этих систем — 3 мл.

На первом этапе ренатурации применяли при 10 или 20°C системы с различными значениями pH, включая pH 5.0 и 6.0 (20 мМ MES) и 7.0–9.0 (20 мМ трис-HCl), содержащие 0.4 М сахарозы, 4 мМ L-цистеина и 0.4 мМ L-цистина.

Затем оптимизировали окислительно-восстановительный потенциал ренатурирующего буфера. Сравнительную эффективность восстанавливающих агентов определяли в 20 мМ NaФБ, pH 7.4, содержащего 0.4 М сахарозу и дитиотреитол (ДТТ) с различной концентрацией (0.1, 1, и 5 мМ) или пары L-цистеин/L-цистин в соотношении 0.1/0.1, 1/0.1, 5/0.1, 0.1/1, 1/1, 5/1, 0.1/5, 1/5, и 5/5 мМ.

Для установления оптимальной конечной концентрации белка и мочевины проводили рефолдинг в 20 мМ NaФБ, pH 7.4, содержащем 0.4 М сахарозу, 2.5 мМ ДТТ и белок в конечной концентрации 150, 200, 300 и 600 мкг/мл. Концентрация мочевины при этом составляла 0.5, 0.67, 1.0 и 2.0 М соответственно.

На заключительном этапе был проведен скрининг соединений, обладающих антиагрегационной активностью. Протестированы: 0.1, 0.5, и 1.0%-ные растворы Kolliphor EL, 0.1, 0.5 и 1%-ный полиэтиленгликоль 3000 (ПЭГ с M<sub>r</sub> 3000), 0.1, 0.2, и 0.4 М глицерол, 0.1, 0.2, и 0.4 М сахароза. Конечная концентрация белка — 150 мкг/мл. Все соединения готовили на основе 20 мМ NaФБ, pH 7.4, с 2.5 мМ ДТТ.

Лучшей системой на каждом этапе рефолдинга считалась та, в которой после 12–14 ч инициации ренатурации детектировалась наиболее высокая ферментативная активность и мономерная форма целевого белка, а также наблюдалась наименьшая степень агрегации.

**Масштабирование процесса ренатурации.** Определив оптимальный состав и параметры рефолдинг-буфера – 20 мМ NaФБ, pH 7.4, содержащий 0.4 М сахарозы и 2.5 мМ ДТТ, при 10°C было проведено масштабирование процесса ренатурации в 100 раз. Для этого 25 мл фракции, полученной после элюции с SP-сефарозы, как описано выше, разводили в 12 раз в этом рефолдинг буфере в один этап при постоянном перемешивании на магнитной мешалке до конечной концентрации белка 150 мкг/мл. Сосуд с разведенным белком переносили в холодильник на 18 ч. Окончательную очистку и сбор целевого белка проводили, как описано выше для очистки на SP-сефарозе, после чего рассчитывали выход и активность полученного препарата белка.

**Измерение специфической активности.** Антистафилококковую активность измеряли по модифицированному методу, описанному в работе [9]. Его принцип заключался в регистрации снижения оптической плотности при 600 нм стационарной культуры *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923) после лизиса бактериальных клеток при добавлении фракции, содержащей ренатурированный LysK<sub>CA</sub>. За единицу активности (МЕ) принимали такое количество белка, которое приводило к снижению оптической плотности культуры *S. aureus* при 600 нм с 0.4 до 0.2 ед. за 15 мин после добавления исследуемого белка. Измерение проводили на термостатируемом планшетном ридере SpectraMax M2 (“Molecular Devices”, США).

**ДДС-электрофорез в полиакриламидном геле.** Чистоту белковых фракций и содержание мономерной формы рекомбинантного LysK<sub>CA</sub> после ренатурации оценивали методом электрофореза с Na-ДДС в 12.5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе Mini-PROTEAN II (“BioRad”, США) [23]. Окраску гелей проводили красителем кумасси ярко-синим R-250 (СВВ R-250) или серебром по методу, описанному в работе [24].

**УФ-видимая спектроскопия.** Для определения концентрации общего белка использовали модифицированный метод Лоури [25]. Агрегацию во время подбора условий рефолдинга регистрировали при 340 нм через 30 мин и 14 ч после инициации ренатурации на спектрофотометре Cary-50 Bio (“Varian”, Австралия). Концентрацию очищенного препарата эндолизина К определяли, используя коэффициент молярной экстинкции LysK<sub>CA</sub>  $\epsilon_{280} = 89395 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [26].

**Обработка и визуализация результатов.** Обработка и графическое отображение результатов выполнено по программе SigmaPlot 13.1, определение чистоты (денситометрический анализ) целевого белка – по TotalLab 2.0, построение 3D-модели LysK<sub>CA</sub> осуществлено с применением онлайн платформы Phyre2, а визуализация полученной модели выполнена по программе Chimera 1.8.1.

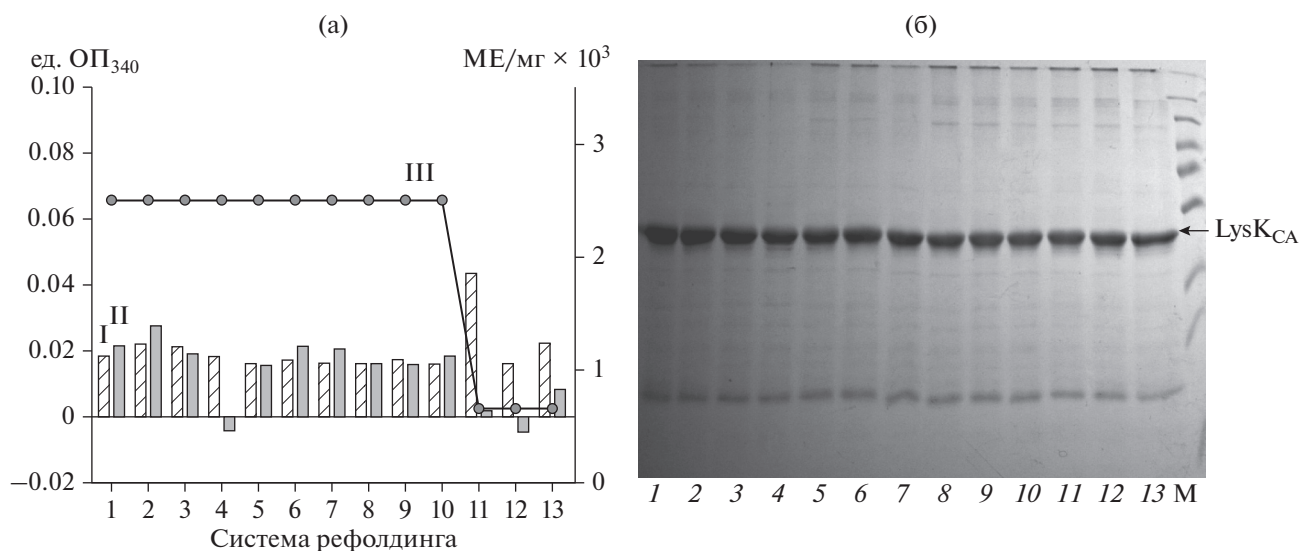
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени описано большое количество методов получения рекомбинантных белков из ТВ. Но, несмотря на общность алгоритмов получения таких белков в активной форме, которые включают этапы солиubilизации ТВ, очистки целевого белка от примесных соединений и его рефолдинг, на данный момент не существует универсального. Это в первую очередь связано с индивидуальными характеристиками каждого отдельного белка [16, 21]. Как уже отмечалось, этап ренатурации является лимитирующим и определяет эффективность выхода целевого продукта. Он зависит, как от физико-химических условий среды (рефолдинг буфера), так и от конечной концентрации белка [16–19].

Параметры рефолдинг буфера (pH, температура, редокс потенциал, конечная концентрация белка и химический состав среды) были протестированы в данной работе на этапе определения условий ренатурации LysK<sub>CA</sub> методом разведения.

На первом этапе изучали зависимость рефолдинга LysK<sub>CA</sub> от pH (5–10) и температуры (10 и 20°C) ренатурирующего буфера, который содержал 0.4 М сахарозу в качестве стабилизатора и редокс систему цистеин/цистин (4 мМ /0.4 мМ). Установлено, что при повышенной температуре (20°C) и приближении значения pH к pI целевого белка (9.58) возрастала его агрегация в этих системах, хотя специфическая активность была обнаружена во всех исследуемых растворах. При 20°C в системах с pH от 7 до 9 шло формирование молекулярных изоформ целевого белка, которые были видны на электрофореграмме в виде двойных полос, чего не наблюдалось при 10°C (результаты не представлены).

Можно предположить, что увеличение степени агрегации при повышенных значениях pH связано, во-первых, с повышенной реакционной способностью цистеинов и образованием межмолекулярных и некорректных внутримолекулярных дисульфидных связей. А, во-вторых, щелочные значения pH среды, близкие к pI молекулы LysK<sub>CA</sub>, могли приводить к элиминации электростатического отталкивания промежуточных форм молекулы, что вызывало их взаимодействие, и как следствие, дальнейшую агрегацию [4, 20].



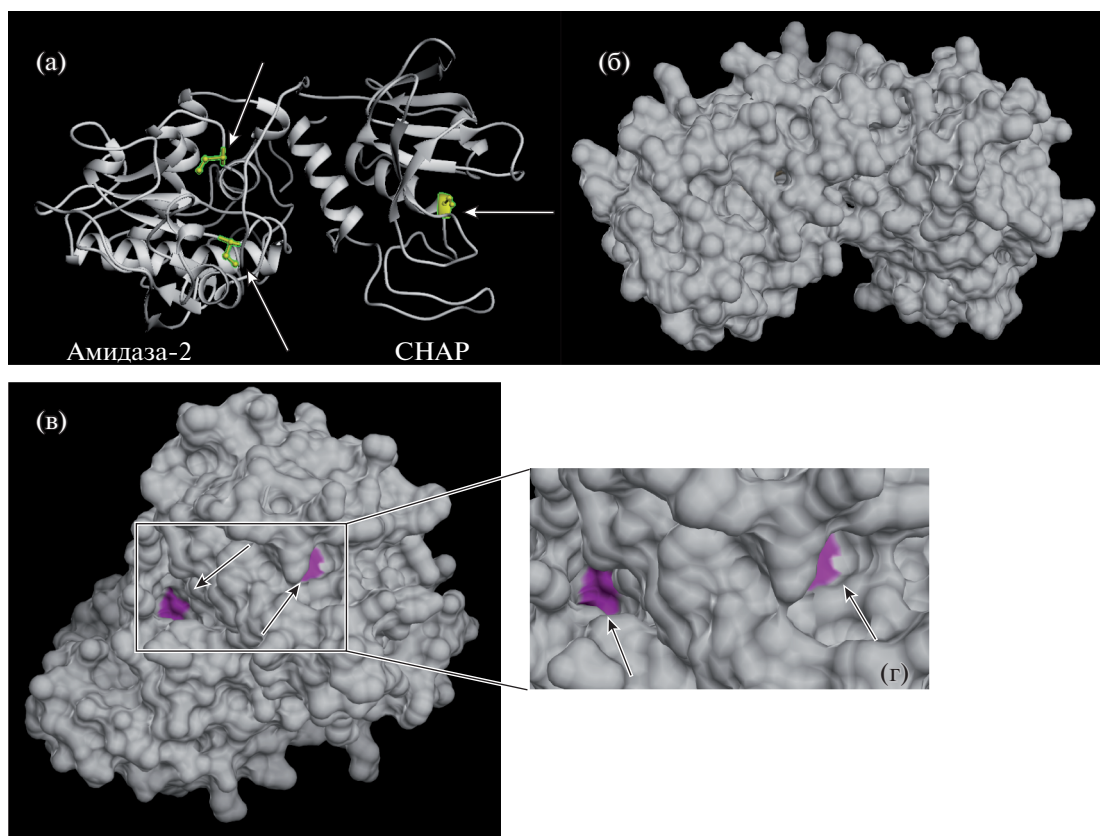
**Рис. 1.** Влияние окислительно-восстановительного потенциала рефолдинг буфера на эффективность ренатурации рекомбинантного LysK<sub>CA</sub>, активность LysK<sub>CA</sub> (III) и степень агрегации образцов через 1(I) и 14 (II) ч (а), и электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в не редуцирующих условиях (б) в присутствии: 1 – буфер без низкомолекулярных тиолов, 2 – 0.1 мМ ДДТ, 3 – 1 мМ ДДТ, 4 – 5 мМ ДДТ, 5 – 0.1 мМ L-цистеина и L-цистина, 6 – 1 мМ L-цистеина и 0.1 мМ L-цистина, 7 – 5 мМ L-цистина и 0.1 мМ L-цистина, 8 – 0.1 мМ L-цистеина и 1 мМ L-цистина, 9 – 1 мМ L-цистеина и L-цистина, 10 – 5 мМ L-цистеина и 1 мМ L-цистина, 11 – 0.1 мМ L-цистеина и 5 мМ L-цистина, 12 – 1 мМ L-цистеина и 5 мМ L-цистина и 13 – 5 мМ L-цистеина и 5 мМ L-цистина; М – белки-маркеры молекулярных масс (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 и 10 кДа); окраска СВВ R-250. Все системы готовили на основе 20 мМ Na-ФБ, pH 7.4, с 0.4 М сахарозой.

На следующем этапе работы была подобрана оптимальная редокс система для рефолдинга LysK<sub>CA</sub>. Для этого изучена зависимость активности и агрегации целевого продукта от концентрации и соотношения цистина, цистеина и дитиотреитола в ренатурирующем буфере (рис. 1). Установлено, что литическая активность LysK<sub>CA</sub> восстанавливалась, достигала максимально возможных значений и оставалась неизменной вплоть до соотношения цистеин : цистин 5 : 1. Увеличение концентрации L-цистина до 5 мМ приводило к снижению активности фермента в 4 раза (рис. 1а). Это, вероятно, было обусловлено окислением SH-групп цистеина и образованием не нужной дисульфидной связи в этой среде, в том числе возможно и межмолекулярных, так как степень агрегации после 1 ч ренатурации в данных условиях оказывалась выше, чем в среде с более низкой концентрацией цистина.

Было выбрано 2.5 мМ ДТТ, которое составило промежуточное значение между концентрациями 1 и 5 мМ, поскольку в этих условия ренатурация целевого белка проходила с образованием мономерной и активной формы фермента, а также сопровождалась низкой степенью агрегации. Это обусловлено тем, что использованное соединение позволяло поддерживать в восстановленном состоянии три сульфгидрильные группы остатков цистеина в структуре белка (рис. 2а).

Анализ аминокислотной последовательности показал, что в структуре LysK<sub>CA</sub> имелось три аминокислотных остатка цистеина. Моделирование пространственной структуры на базе сервиса Phyre2, которое выявило 99 и 100%-ную гомологию SHAP и амидаза-2 домена, соответственно, с соответствующими доменами эндолизина LysGH15, показало, что все три остатка находятся в свободном состоянии (рис. 2а). Однако они не участвовали в формировании поверхности молекулы, а располагались в углублениях активных центров доменов (рис. 2б, 2в). Одна сульфгидрильная группа находилась в каталитическом центре SHAP-домена [27]. Две другие SH-группы, как и в родственном эндолизине LysGH15, располагались в амидазном домене, одна из которых также в активном центре [28, 29]. Таким образом, в активном состоянии LysK<sub>CA</sub> должен содержать все три остатка Цис в восстановленном состоянии.

В связи с этим можно объяснить наличие активности данного белка в среде с ДТТ и цистеином, присутствующих в рефолдинг буфере. Они обеспечивали поддержание свободных сульфгидрильных групп в восстановленном состоянии именно во время ренатурации, так как данные группы не участвовали как в формировании поверхности молекулы, так и соответственно в каких либо межмолекулярных взаимодействиях после принятия нативной конформации (рис. 2б).



**Рис. 2.** Трехмерная структура эндолизина  $LysK_{CA}$ , включающая элементы вторичной структуры с тремя остатками цистеина (белые стрелки, а), остатки цистеина не присутствовали на поверхности молекулы (б), располагались в углублениях — карманах активных центров (черные стрелки, в и г).

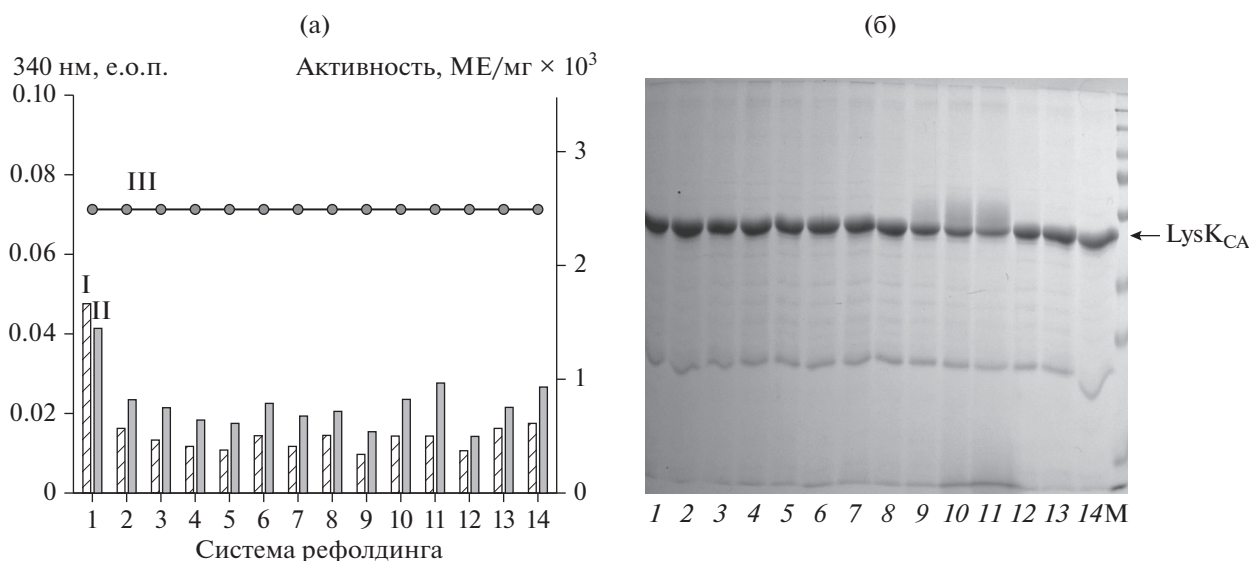
Об этом также свидетельствовало отсутствие влияния низкомолекулярных тиолов (ДТТ и  $\beta$ -меркаптоэтанола) на структуру и активность полноразмерной нативной молекулы  $LysK$ , что было установлено ранее и для  $LysK_{CA}$  [30].

В то же время противоположный эффект наблюдался при наличии в среде высоких концентраций окисленного тиолата (рис. 1а). Так, при содержании в буфере 5 мМ цистина ферментативная активность  $LysK_{CA}$  практически полностью отсутствовала. Можно предположить, что при окислении SH-групп во время рефолдинга формировалась одна из трех возможных дисульфидных связей, образуя неправильную конформацию белка, или формировался смешанный дисульфид с цистином сульфгидрильной группы в каталитическом центре СНАР домена уже после ренатурации, поскольку именно этот домен и этот аминокислотный остаток из триады Цис-Гис-Глу в активном центре ответственны за проявление специфической активности [8, 9, 27].

После установления физических параметров ренатурирующего буфера была изучена зависимость эффективности рефолдинга от конечной концентрации целевого продукта и мочевины.

Наилучший эффект был обнаружен при разведении исходного белка до его конечной концентрации в рефолдинг буфере 0.15 и 0.2 мг/мл, а мочевины 0.5 и 0.67 М соответственно. Такая же активность ( $2.5 \times 10^3$  МЕ/мг) наблюдалась при тех же разведениях, но с конечной концентрацией мочевины 2 М, хотя на основании турбидиметрического исследования это хаотропное соединение снижало степень агрегации (результаты не представлены). При разведении белка до конечной концентрации 0.3 мг/мл, а мочевины до 1 М активность  $LysK_{CA}$  падала в 4 раза, а при конечной концентрации белка 0.6 мг/мл и мочевины 2 М активность полностью исчезала. Это связано с тем, что при повышении в растворе концентрации белка возрастала и степень неправильного фолдинга и агрегации, напрямую зависящие от нее. Образование нативной конформации протекало в соответствии с кинетикой реакций первого порядка, в то время как агрегация должна подчиняться процессам второго (или высших) порядков, соответственно скорость агрегации выше скорости ренатурации при высоких исходных концентрациях денатурированного белка в растворе [16, 19].





**Рис. 3.** Сравнительная эффективность действия антиагрегационных соединений на рефолдинг рекомбинантного LysK<sub>CA</sub> (III) по результатам турбидиметрического анализа (а) активность (III) и степень агрегации образцов через 1 (I) и 14 (II) ч и электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в не редуцирующих условиях (б) в присутствии: 1 – буфера без добавок, 2 – 1.5 М мочевины, 3 – 0.1 М сахарозы, 4 – 0.2 М сахарозы, 5 – 0.4 М сахарозы, 6 – 0.1 М глицерола, 7 – 0.2 М глицерола, 8 – 0.4 М глицерола, 9 – 0.1% Kolliphor EL, 10 – 0.5% Kolliphor EL, 11 – 1.0% Kolliphor EL, 12 – 0.1% ПЭГ 3000, 13 – 0.5% ПЭГ 3000, 14 – 1% ПЭГ 3000; М – белки-маркеры молекулярных масс; окраска СВВ R-250; все системы содержали 20 мМ NaФБ, рН 7.4, содержащем 2.5 мМ ДТТ.

В результате было выбрано разведение в 12 раз с конечной концентрацией белка 0.15 мг/мл, при котором наблюдалась наименьшая степень агрегации, а LysK<sub>CA</sub> находился в мономерной и активной форме.

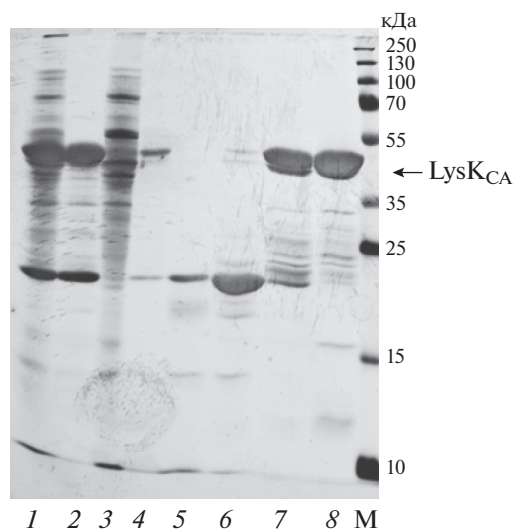
Как уже было отмечено, остатки цистеина не участвовали в формировании поверхности, что могло бы стать причиной неспецифического взаимодействия между молекулами белка и дальнейшей агрегации. В переходном состоянии “расплавленной” глобулы эти остатки поддерживались в восстановленном состоянии присутствием ДТТ или L-цистеина. Можно предположить, что за агрегацию отвечали неспецифические гидрофобные взаимодействия переходных форм молекулы LysK<sub>CA</sub>, особенно при его высоких концентрациях. В связи с этим при рефолдинге методом разведения часто применяют добавки различной химической природы, обладающие антиагрегационным действием и ингибирующие взаимодействие переходных состояний между собой [19, 21].

На наличие такого эффекта на заключительном этапе данной работы были протестированы сахароза и глицерол, мочевины, Kolliphor EL и ПЭГ 3000. Как видно из полученных результатов, сравнение с системой без добавок показало, что все соединения проявили примерно одинаковый антиагрегационный эффект (рис. 3а). Однако из результатов по стабилизации переходных состояний молекулы LysK<sub>CA</sub>, и антиагрегационного дей-

ствия изученных соединений, видно, что полного подавления агрегации не наблюдалось. Практически для всех соединений удалось добиться снижения мутности растворов в 2 раза по сравнению с контролем без добавок. Это значение светорассеяния в скрининг растворах наблюдалось и на первых его трех этапах, так как первоначально во всех системах присутствовала сахароза. Этот эффект наблюдали и в присутствии 2 М мочевины на этапе определения ее конечной концентрации. В итоге в качестве антиагреганта была выбрана 0.4 М сахароза, как одно из наиболее эффективных, доступных и дешевых соединений.

Условия рефолдинга, определенные на этапе скрининга для каждого белка, были отправной точкой при масштабировании процесса ренатурации. Однако увеличение масштабов данного процесса могло привести к нежелательным последствиям, связанным с увеличением агрегации. Это могло быть вызвано увеличением общего количества внесенного белка, а также повышенной локальной его концентрацией и денатуранта, что возникало вследствие сложности перемешивания больших объемов, и приводило к увеличению вероятности встречи несвернутых или переходных состояний молекул белка друг с другом [16, 20]. Стократное масштабирование рефолдинга методом разведения в выбранном рефолдинг буфере увеличивало степень агрегации и в данном случае.

Тем не менее после масштабирования процесса ренатурации и сбора целевого белка на SP-се-



**Рис. 4.** Электрофорез в 12.5%-ном ПААГ с Na-ДДС продуктов, получаемых на различных этапах масштабирования очистки и рефолдинга методом разведения рекомбинантного LysK<sub>CA</sub>: 1 – солилизат ТВ, 2 – свободный объем с DE-сефарозы, 3 – элюция с DE-сефарозы, 4 – фракция в рефолдинг буфере, 5 – фракция 1, элюирующаяся буфером Б<sub>1</sub> с SP-сефарозы, 6 – фракция 2, элюирующаяся буфером Б<sub>1</sub> с SP-сефарозы, 7 – фракция 1, элюирующаяся буфером Б<sub>2</sub> с SP-сефарозы, 8 – фракция 2, элюирующаяся буфером Б<sub>2</sub> с SP-сефарозы; М – белки-маркеры молекулярных масс (окраска серебром).

фарозе выход рефолдинга целевого белка составил  $29.5 \pm 6.7\%$  с чистотой целевого продукта около 75%, рассчитанной на основании анализа результатов ЭФ (рис. 4). На рис. 4 видна гетерогенность LysK<sub>CA</sub> на всех этапах его получения – от солилизации ТВ до сбора целевого продукта после ренатурации. Введение дополнительного этапа очистки на катионообменнике позволило получить LysK<sub>CA</sub> с чистотой около 90% в конечном препарате белка, обладающего ферментативной активностью  $1.8 \pm 0.73 \times 10^3$  МЕ/мг, что почти в три раза выше активности, проявляемой полноразмерной молекулой LysK ( $0.621 \times 10^3$  МЕ/мг) [9, 13].

Можно заключить, что наибольший эффект на ренатурацию данного белка оказывали физические параметры буфера, правильно подобрав которые можно добиться увеличения выхода ренатурированного белка, если такой скрининг не проводить. Следует добавить, что при подборе условий рефолдинга может быть весьма полезной информация анализа третичной структуры белка, если не известно количество дисульфидных связей при наличии в его молекуле остатков цистеина. Зная их расположение, можно определить тип окислительно-восстановительного соединения.

Масштабирование процесса рефолдинга позволило получить рекомбинантный LysK<sub>CA</sub> с выходом

$29.5 \pm 6.7\%$  и активностью  $1.8 \pm 0.73 \times 10^3$  МЕ/мг. В перерасчете на массу ТВ и объем культуры можно из 2.25 г отмытых ТВ (0.16 л культуры) выделить около  $16 \pm 2.3$  мг целевого белка, то есть около 100 мг с 1 л ферментируемой культуры.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 172.
2. Palomares L.A., Kuri-Breña F., Ramírez O.T. // *Encyclopedia of Life Support Systems.* 2002. V. 6. № 3. P. 8.
3. Birch J.R., Onakunle Y. *Therapeutic Proteins.* Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. P. 1–16.
4. Li Y. // *Protein Expr. Purif.* 2011. V. 80. № 2. P. 260–267.
5. Czaplowski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V.A., Henderson I.R. // *Lancet Infect. Dis.* 2016. V. 16. № 2. P. 239–251.
6. O'flaherty S., Coffey A., Meaney W., Fitzgerald G.F., Ross R.P. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 20. P. 7161–7164.
7. Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 287. № 2. P. 185–191.
8. Becker S.C., Dong S., Baker J.R., Foster-Frey J., Pritchard D.G., Donovan D.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. V. 294. № 1. P. 52–60.
9. Horgan M., O'Flynn G., Garry J., Cooney J., Coffey A., Fitzgerald G.F., McAuliffe O. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. № 3. P. 872–874.
10. Fenton M., Casey P.G., Hill C., Gahan C.G., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A. // *Bioengineered Bugs.* 2010. V. 1. № 6. P. 404–407.
11. Schmelcher M., Loessner M.J. // *Curr. Op. Biotechnol.* 2016. V. 37. P. 76–87.
12. Schmelcher M., Shen Y., Nelson D.C., Eugster M.R., Eichenseher F., Hanke D.C., Becker S.C. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2015. V. 70. № 5. P. 1453–1465.
13. Haddad Kashani H., Fahimi H., Dasteh Goli Y., Moniri R. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. V. 7. P. 290–301.
14. Fenton M., Ross R.P., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A. // *Appl. Microbiol.* 2011. V. 111. № 4. P. 1025–1035.
15. Keary R., Sanz-Gaitero M., J. van Raaij M., Mahony J., Fenton M., McAuliffe O., Coffey A. // *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2016. V. 17. № 2. P. 183–190.
16. Jungbauer A., Kaar W. // *J. Biotechnol.* 2007. V. 128. № 3. P. 587–596.
17. Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. // *Curr. Op. Biotechnol.* 1998. V. 9. № 5. P. 497–501.
18. Shin H. C. // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2001. V. 6. № 4. P. 237–243.
19. Rudolph R., Lilie H. // *FASEB J.* 1996. V. 10. № 1. P. 49–56.
20. Eiberle M.K., Jungbauer A. // *Biotech. J.* 2010. V. 5. № 6. P. 547–559.
21. Qoronfle M.W., Hesterberg L.K., Seefeldt M.B. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 55. № 2. P. 209–224.

22. Жидецкий А.В., Шолух М.В., Ханнеман Ю.П., Хандрик Р., Мотылевич Ж.В., Химанен Ю.П. // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 58–65.
23. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
24. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. // Biochemistry. 1971. V. 10. № 13. P. 2606–2617.
25. Peterson G.L. // Method. Enzymol. 1983. V. 91. P. 95–119.
26. Pace N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. // Protein Sci. 1995. V. 4. № 11. P. 2411–2423.
27. Sanz–Gaitero M., Keary R., Garcia–Doval C., Coffey A., van Raaij M.J. // Virol. J. 2014. V. 11. № 1. P. 133–144.
28. Firczuk M., Bochtler M. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. № 6. P. 676–691.
29. Gu J., Feng Y., Feng X., Sun C., Lei L., Ding W., Liu X // PLoS Pathog. 2014. V. 10. № 5. P. e1004109.
30. Filatova L.Y., Becker S.C., Donovan D.M., Gladilin A.K., Klyachko N.L. // Biochimie. 2010. V. 92. № 5. P. 507–513.

## Screening the Refolding Conditions and Receiving the Recombinant Anti-Staphylococcal Endolysin LysK<sub>CA</sub> in Active Form from *E. coli* Inclusion Bodies

A. V. Žydziecki<sup>a,\*</sup>, S. G. Golenchenko<sup>a</sup>, V. A. Prakulevich<sup>a</sup>, and M. V. Sholukh<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, Faculty of Biology, Minsk, 220030 Belarus

\*e-mail: Zhydzetski@gmail.com

Received April 17, 2019; revised July 29, 2019; accepted August 30, 2019

Endolysin LysK is a bacteriophage K peptidoglycan hydrolase consisting of two catalytic (CHAP and amidase-2) – LysK<sub>CA</sub> and one structural (SH3b) domains. As full-length molecule of the enzyme, as well as its truncated forms containing CHAP domain possess high anti-bacterial activity with regard to cells of *Staphylococcus* genus. In this connection LysK and its active species have a great potential for medicine and veterinary science when developing novel more effective anti-staphylococcal drugs. Stepwise screening of the main refolding buffer properties allowing to get endolysin LysK<sub>CA</sub> in active form from *E. coli* inclusion bodies (IBs) was proposed. On the basis of comparative analysis optimal values of pH, temperature, redox potential, protein concentration and type of chemical additives were determined. System containing 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.4 M sucrose, 2.5 mM DTT, 10°C with final concentration of LysK<sub>CA</sub> in the solution about 150 µg/ml was found to be optimal. The refolding yield after its scaling-up was about 29.5 ± 6.7%, which let obtain 16 ± 2.3 mg of the target protein from 2.25 g of washed IBs (per 0.16 L of culture medium) with 1.8 ± 0.73 × 10<sup>3</sup> U/mg specific enzyme activity.

**Keywords:** Recombinant endolysin LysK<sub>CA</sub>, protein refolding, inclusion bodies, screening the renaturation conditions

УДК 577.12:579.841.3

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СИНТЕЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ *Rhizobium phaseoli*

© 2020 г. О. В. Космачевская<sup>1</sup>, Е. В. Осипов<sup>1</sup>, Чан Ван Ти<sup>2</sup>, Фам Тхи Туэт Май<sup>2</sup>, А. Ф. Топунов<sup>1, \*</sup>

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

<sup>2</sup>Университет сельского и лесного хозяйства, Тхайнгуен, 251210 Вьетнам

\*e-mail: aftorunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 20.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Изучен синтез поли-3-гидроксимасляной кислоты (ПГБ) в клетках клубеньковых бактерий *Rhizobium phaseoli*, выращенных в глубоководной культуре. Модифицирован метод Лоу для определения ПГБ, что позволило выделить и определить количество полимера непосредственно в биомассе. Только S-формы клеток *R. phaseoli* были способны к синтезу ПГБ. На богатой углеродом среде накопление ПГБ шло сильнее (примерно на 50%), а гранулы полимера были более ярко выражены. Синтез ПГБ увеличивался при понижении аэрации, а максимум содержания достигался к 35–40 ч роста. Было изучено влияние окислительного стресса, вызываемого пероксидом третбутила и бензилвиологеном на рост бактерий, синтезирующих ПГБ. Оба вещества негативно влияли на рост бактерий, при этом рост восстанавливался только у S-формы, синтезирующей ПГБ. Можно сделать вывод, что ПГБ является протектором для клубеньковых бактерий при окислительном стрессе. Максимальное содержание ПГБ в клетках *R. phaseoli* достигало 54% от сухой массы клеток, что превышает значения, ранее описанные для клубеньковых бактерий. Эта величина близка к значениям, характерным для бактериальных штаммов – продуцентов полимера, используемых в биотехнологии. Можно сделать вывод, что клубеньковые бактерии, выращенные в глубоководной культуре, могут быть потенциальными продуцентами ПГБ и других полигидроксиалканоатов.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, *Rhizobium phaseoli*, поли-3-гидроксибутират, R- и S-формы бактерий, окислительный стресс

**DOI:** 10.31857/S0555109920010109

Липидоподобные включения, окрашивающиеся липофильными красителями, впервые были обнаружены в бактериях *Azotobacter chroococcum* в начале прошлого столетия [1]. Состав вещества был выяснен в 1926 г. благодаря наблюдению, что в анаэробных условиях происходит подкисление суспензии *Bacillus megaterium*.

Образовавшаяся кислота была идентифицирована как 3-гидроксимасляная, а вещество – источник этой кислоты, как поли-3-гидроксибутират (ПГБ) [2]. В конце 1950 гг. была опубликована работа, посвященная синтезу ПГБ у бактерий рода *Bacillus*, где была описана процедура выделения гранул ПГБ щелочным гипохлоритом [3]. Стало возможным выделять ПГБ из клеток, была исследована динамика роста и синтеза ПГБ для водородоокисляющей бактерии *Alcaligenes eutrophus* (современное название – *Ralstonia eutropha*).

Обнаружено увеличение содержания ПГБ в клетках в стационарной фазе, когда число клеток

оставалось постоянным [4]. В последующих работах изучался синтез полимера на разных средах, ферменты, участвующие в синтезе. К концу 60 гг. стало ясно, что синтез этого резервного полимера – широко распространенное явление среди грамотрицательных бактерий. В обзоре [5] ПГБ впервые рассматривался как бактериальное резервное вещество, функционально аналогичное крахмалу и гликогену у эукариот. ПГБ – это лишь один из возможных полимеров группы полигидроксиалканоатов (ПГА), которые могут содержать в качестве мономеров и другие подобные гидроксибутирату соединения.

В дальнейшем было описано клонирование генов, участвующих в биосинтезе резервных полиэфиров, были клонированы гены *R. eutropha*, кодирующие ферменты биосинтеза ПГА, и получены рекомбинантные штаммы *Escherichia coli* с функционально активным комплексом этих генов [6–8]. Детальные исследования на *R. eutropha*

показали, что только три фермента участвуют в биосинтезе ПГБ из ацетил-КоА. Ключевым является фермент, ответственный за реакцию полимеризации и названный ПГА-синтазой. К настоящему времени клонировано около 40 структурных генов ПГА-синтазы из более чем 30 видов бактерий. Успешное клонирование генов биосинтеза ПГА сделало возможным создание трансгенных растений, которые рассматриваются как возможные продуценты ПГА в будущем [9, 10].

ПГБ был обнаружен у многих азотфиксирующих бактерий, в том числе у *Azotobacter* и *Rhizobium* [11], причем у всех исследованных видов этих родов. Практически сразу обмен ПГБ стали связывать с процессом фиксации атмосферного азота, а поскольку клубеньковые бактерии (КБ) рода *Rhizobium* фиксируют азот в условиях симбиоза с бобовыми растениями, то обмен ПГБ в основном изучали в бактериоидах – симбиотической форме этих бактерий, находящейся в клубеньках. Было показано, что в бактериоидах *Rhizobium* содержится гранулы ПГБ, содержание которой может достигать 50–60% от сухой массы клетки [12, 13]. Накопление ПГБ было показано и для бактериоидов КБ, которые теперь относят к роду *Bradyrhizobium*: *B. japonicum* и *B. elkanii* [14]. Бактериоиды *R. meliloti* являются одним из видов, который не накапливает ПГБ во время симбиоза [15].

У многих бактерий ПГБ известен в качестве запасного вещества, активно участвующего в метаболизме углеводов и обмен которого тесно связан с функционированием цикла Кребса [5, 12]. Показано, как ризобияльные штаммы аккумулируют ПГА в качестве аккумуляторов энергии [16]. Накопленный в бактериях ПГА способствует быстрой колонизации ризосферы, эффективной нодуляции и азотфиксации [17], при этом способность накапливать ПГБ бактериоидами в клубеньке прямо коррелирует с типом клубенька: детерминированным или недетерминированным [16].

В Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН было показано, что в процессе вегетации бобовых растений скорость распада ПГБ в бактериоидах *R. lupini* (сейчас *Bradyrhizobium lupini*) наиболее высока при максимальной азотфиксации [18], когда ферменты синтеза и распада ПГБ особенно активны [19]. На основании этих и некоторых других данных можно сделать заключение, что при азотфиксации одновременно происходит и синтез и распад ПГБ, то есть это запасное вещество находится в состоянии активного обмена. ПГБ обеспечивает метаболизм бактериоидов в микроаэробных условиях, существующих в центральной зоне клубенька, когда основная часть кислорода задерживается барьером газовой диффузии в коре, а кислород поступает к бактериоидам в связанным с леглобнином – симбиотическим гемоглобином бобового растения [20–23].

В то же время работ по изучению ПГБ в клубеньковых бактериях, находящихся в свободноживущем состоянии, крайне мало. Можно отметить работу Стама с соавт. о распаде ПГБ в бактериях рода *Rhizobium* [24], и статью о функционировании генов, отвечающих за синтез этого полимера в бактериях *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* [25]. Поскольку в свободноживущем состоянии нитрогеназа в бактериях не экспрессируется, ПГБ работает как “утилизатор” для избытка НАД(Ф)Н при не очень активном цикле Кребса. Регулируя три разных пути окисления НАД(Ф)Н, различные штаммы *Rhizobium* способны функционировать в разных условиях [26].

Цель работы – изучение влияния условий выращивания на синтез ПГБ различными формами клубеньковыми бактериями *R. phaseoli* в глубоководной культуре.

## МЕТОДИКА

**Использованные реактивы.** В работе использовали среду LB,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , PMSF, восстановленный глутатион, глутамат натрия, ксилит – “AppliChem” (Германия); бензилвиологен – Merck” (Германия); Трис – “ICN” (США); пероксид трет-бутила, сафранин, Судан черный В – “Sigma-Aldrich” (США); Нильский красный – “Acros Organics” (Бельгия); пероксид водорода,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , маннит, уксусная кислота, этанол, хлороформ, этиленгликоль,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Россия). Гороховая мука была приготовлена размолотом коммерческих сухих семян гороха посевного луцильного (*Pisum sativum* L. convar. *sativum*), выращенного в Ставропольском крае (Россия).

**Условия культивирования.** В работе использовали клубеньковые бактерии *R. phaseoli* (эффективный штамм 682) из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Москва, Россия).

В опытах были использованы питательные среды следующего состава (г/л). Питательная среда № 1: гороховая мука – 10; маннит – 6,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  – 2.8;  $\text{MgSO}_4$  – 0.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.5;  $\text{NaCl}$  – 0.1. Питательная среда № 2: гороховая мука – 10;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  – 5; глутамат натрия – 1.5; маннит – 15,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  – 2.4;  $\text{MgSO}_4$  – 0.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.5;  $\text{NaCl}$  – 0.1. Соотношение количества С : N составляло: для среды № 1 – 3 : 1; для среды № 2 – 20 : 1. Для поддержания культуры использовали агаризованную (3%) среду № 2. Для выращивания посевного материала смешивали равные объемы среды № 1 и № 2.

Для изучения биосинтеза ПГБ в аэробных условиях бактерии выращивали в колбах Эрленмейера со 150 мл питательной среды на качалке (200 об./мин) при 28°C. Посевную культуру выращивали в течение 24 ч до оптической плотности

$A_{600} = 0.2-0.25$ . Посев проводили смывом со скошенного агара (S-форма) или 2 мл культуры, замороженной в глицерине (R-форма). В вариантах опыта в колбы вносили по 10% посевного материала, затем культивировали в течение 60 ч. При синтезе ПГБ в микроаэрофильных условиях пробки колб со средой № 2 заматывали полиэтиленовой пленкой, предотвращавшей доступ воздуха к культуральной жидкости. Отбор проб в обоих случаях производили каждые 6 ч, в пробах определяли концентрацию биомассы и содержание ПГБ.

**Обработка клеток редокс-медиаторами.** На 38 ч культивирования в микроаэрофильных условиях (стационарная фаза роста, пик накопления ПГБ) в колбы вносили водный раствор пероксида третбутила до конечной концентрации 0.1 мМ или раствор бензилвиологена в этаноле до конечной концентрации 1.0 мМ. После добавления редокс-медиаторов отбор проб производили каждые 2 ч в течение 10 ч, далее – каждые 6 ч, определяли концентрацию биомассы и содержание ПГБ.

Биомассу (С) определяли по оптической плотности культуральной суспензии при  $\lambda = 600$  нм относительно среды без клеток:  $C = A_{600}/0.134$  мг/мл.

**Определение ПГБ.** Для определения ПГБ в бактериях применяют различные методы. В работе также использовали несколько методик.

**Метод Лоу.** Для получения пленок ПГБ и калибровки флуоресцентного метода был использован метод Лоу [27] в предложенной в работе модификации. Бактериальную суспензию 1 мл (если  $A_{600} \geq 0.2$ ) или 2 мл (если  $A_{600} < 0.2$ ) помещали в микропробирки, центрифугировали 5 мин при 5 тыс. г. К осадку добавляли 1 мл 2 н HCl и инкубировали 1 ч при 100°C, после чего центрифугировали 5 мин при 5 тыс. г. Осадок подсушивали, добавляли 1 мл хлороформа и интенсивно встряхивали. Микропробирки плотно закупоривали и встряхивали в течении ночи при 200 об./мин и при температуре 28°C. В стеклянный флакон отбирали нижнюю прозрачную хлороформ-содержащую фракцию и высушивали на воздухе. На дне флакона образовывался белый осадок (ПГБ), к которому добавляли 1 мл концентрированной  $H_2SO_4$  и нагревали при 100°C в течение 1 ч. В результате гидролиза и дегидратации образовывалась кротоновая кислота. Оптическую плотность раствора измеряли при 235 нм (максимум оптической плотности кротоновой кислоты, обусловленный двойной связью), используя в качестве контроля концентрированную серную кислоту. Количество ПГБ рассчитывали по формуле:  $[ПГБ] (мг) = 0.0056 \times A_{235}$ .

**Флуоресценция с Нильским красным.** Флуоресцентный метод начали использовать для определения ПГБ в бактериальных клетках достаточно давно и применяют до настоящего времени. Чаще

всего в качестве флуоресцентного красителя используют Нильский красный [28–30]. Именно этот краситель ранее был использован для определения ПГБ в бактериоидах клубеньков люпина [31]. Данный метод – более быстрый и менее трудоемкий, чем метод Лоу, но он не позволяет получить ПГБ в нативном состоянии. В качестве флуоресцентных красителей для определения ПГБ в ряде работ также использовали Акридиновый оранжевый [32] и липофильный краситель Lipid-Green1 (Корея) [33].

В настоящей работе использовали раствор Нильского красного в диметилсульфоксиде – 0.55 мг/мл. Клетки, отобранные на определенной стадии роста, разрушали ультразвуком. Разрушенные клетки центрифугировали и ресуспендировали в воде до  $A_{600} = 0.1$ . К 3 мл суспензии разрушенных клеток добавляли 41 мкл раствора Нильского красного до конечной концентрации 7.5 мкг/мл. Суспензию инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные образцы центрифугировали и ресуспендировали в 3 мл воды.

Исследования также проводили и с целыми клетками. В этом случае раствор Нильского красного добавляли к 3 мл стандартизированной суспензии клеток. Дальнейшую процедуру проводили, как описано выше. Окрашенные клетки центрифугировали и ресуспендировали в 3 мл воды.

Для определения ПГБ записывали спектры флуоресценции образцов при  $\lambda_{возб} = 550$  нм и  $\lambda_{исп} = 610$  нм, при работе с целыми клетками  $\lambda_{исп} = 630$  нм. Количество ПГБ рассчитывали по формуле:  $[ПГБ] (\%) = 0.072 \times E_m$ , где  $E_m$  – эмиссия флуоресценции (отн. ед.).

**Окрашивание Суданом черным.** Метод определения бактериальных жироподобных соединений с красителем Суданом черным был разработан еще в 1940 г. [34], но и в 2015 г. при сравнении различных методов для определения ПГБ в клетках *Rhizobium* была показана его эффективность [32].

Для работы использовали 0.3%-ный раствор Судана черного В в этиленгликоле (может быть использован также раствор в этаноле) и 0.5% водный раствор сафранина. Бактериальную пленку фиксировали нагреванием на предметном стекле, погружали в раствор Судана черного В и окрашивали в течение 15 мин. Краситель сливали, промывали препарат водой и высушивали, после чего промывали предметное стекло поружением в ксилол и высушивали на воздухе. Можно провести дополнительную отмывку в этаноле, в котором судан черным хорошо растворяется. Дополнительно окрашивали препарат водным раствором сафранина в течение 5–10 с. Предметное стекло промывали водой, подсушивали и проводили микроскопию с иммерсионным маслом.

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре Cary 300Bio (“Varian”, США) при комнатной температуре в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин. Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония). Для микроскопии использовали микроскоп ЛОМО (Россия), серия XS, объектив 100/1.25 OIL 160.017.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее все клубеньковые бактерии (КБ) относили к одному роду *Rhizobium*, однако в дальнейшем, с развитием микробиологии и молекулярной генетики, классификация существенно усложнилась, соответственно изменились и названия бактерий. Теперь КБ относят не только к разным родам, но даже к разным семействам протеобактерий. Первыми из рода *Rhizobium* в 1982 г. был выделен род *Bradyrhizobium* [35]. При этом реклассификация видов продолжается до настоящего времени. Так бактерия *Bradyrhizobium lupini* (ранее *Rhizobium lupini*) – микросимбионт растений люпина, один из основных объектов исследований процесса азотфиксации в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, была реклассифицирована только в 2015 г. [36]. Бактерия *Rhizobium phaseoli* – объект данного исследования, микросимбионт растений фасоли, – сохранила свое видовое название. В то же время ко всем клубеньковым бактериям применяют обобщающее название – ризобии.

Известно, что КБ, как и многие другие, могут находиться в различных морфологических формах. Явление диссоциации бактерий на S- (от англ. smooth – гладкий) и R-формы (rough – шероховатый) впервые исследовали Вейль и Феликс в 1917 г. [37], а в 1930 г. это было показано для клубеньковых бактерий [38]. Подробное описание различий между этими формами было приведено в работе Хедли 1927 г. [39], и оно не теряет актуальности до настоящего времени.

Для грамтрицательных (в том числе для клубеньковых) бактерий основной является S-форма. Ее основные признаки: гомогенный рост в бульоне и ограниченный рост на агаре с флуоресцирующими колониями. Колонии гладкие, правильные, выпуклые, могут давать дочерние. Биохимически более активна. Основными признаками R-формы являются агглютинативный рост в бульоне, расплзающийся рост на агаре с редко флуоресцирующими колониями. Колонии шероховатые, неправильные, плоские, дочерние колонии дает редко. Биохимически менее активна.

Полиалканоаты обнаруживаются только у S-форм (с гладкими колониями) большинства грамтрицательных и ряда грамположительных бакте-

рий, что принято считать одним из главных отличий истинной S-культуры от R-формы.

В работе поддержание культуры проводили в S-форме, которая является основной для грамтрицательных бактерий. R-форма была получена при выращивании культуры в неблагоприятных условиях (культивирование на бедной среде с последующим замораживанием при  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Как и можно было предположить, только S-формы клеток исследованного штамма *R. phaseoli* были способны к синтезу ПГБ.

На рис. 1 показаны клетки *R. phaseoli* в S-форме на разных стадиях роста, окрашенные красителем Суданом черным. Включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие капельки, в то время как цитоплазма клеток окрашивается в розовый цвет. На фотографиях хорошо видно увеличение количества гранул ПГБ в клетках со временем выращивания.

Поскольку задачей настоящей работы было изучение накопления ПГБ клетками *R. phaseoli*, возникла необходимость использовать максимально точные методы для определения полимера. Традиционный метод Лоу [27], основанный на спектрофотометрическом определении кротоновой кислоты, образующейся при гидролизе ПГБ, был модифицирован, что позволило выделять и определять количество полимера непосредственно в биомассе, минуя длительные стадии очистки. Кроме того, метод оказался удобным для расчетов, так как зависимость между количеством ПГБ и оптическим поглощением кротоновой кислоты, в нашем случае была линейной. Кроме того, для определения содержания ПГБ непосредственно в клетке использовали метод, основанный на флуоресценции красителя Нильского красного, связывающегося с ПГБ, также дающий линейную зависимость между количеством полимера, определенного по методу Лоу и интенсивностью флуоресценции Нильского красного в ДМСО.

Изучено накопление ПГБ клетками S- и R-формы на бедной (C : N = 3 : 1) и богатой (C : N = 20 : 1) по углероду питательных средах соответственно, поскольку известно, что соотношение азота и углерода очень сильно влияет на метаболизм бактерий, а ПГБ является конечным метаболитом обмена углеводов в бактериальной клетке. При выращивании на двух средах выход биомассы различался незначительно, а накопление ПГБ на богатой по углероду среде № 2 происходило ~ на 50% активнее, при этом гранулы полимера были более ярко выражены. В клетках R-формы ПГБ не накапливался независимо от вида питательной среды, хотя в аэробных условиях биомасса у бактерий этой формы нарастала даже лучше. Различия наглядно видны на графиках (рис. 2). Для накопления ПГБ в клетках необходимо достаточное количество источников углеро-

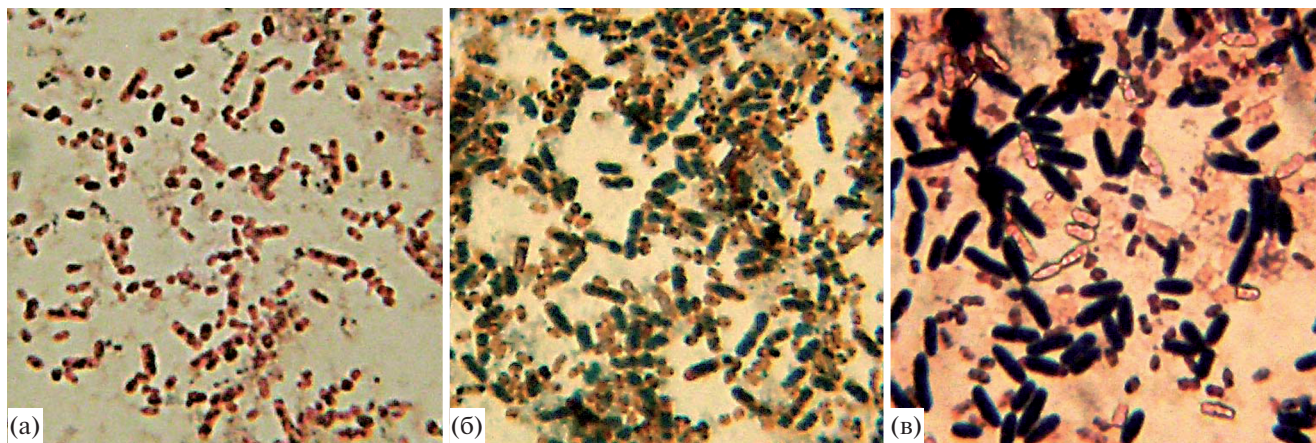


Рис. 1. Клетки *R. phaseoli* (S-форма), окрашенные суданом черным и сафранином, после— 9 (а), 33 (б) и 57 (в) ч роста на среде № 2 в микроаэрофильных условиях. Увеличение  $\times 10000$ .

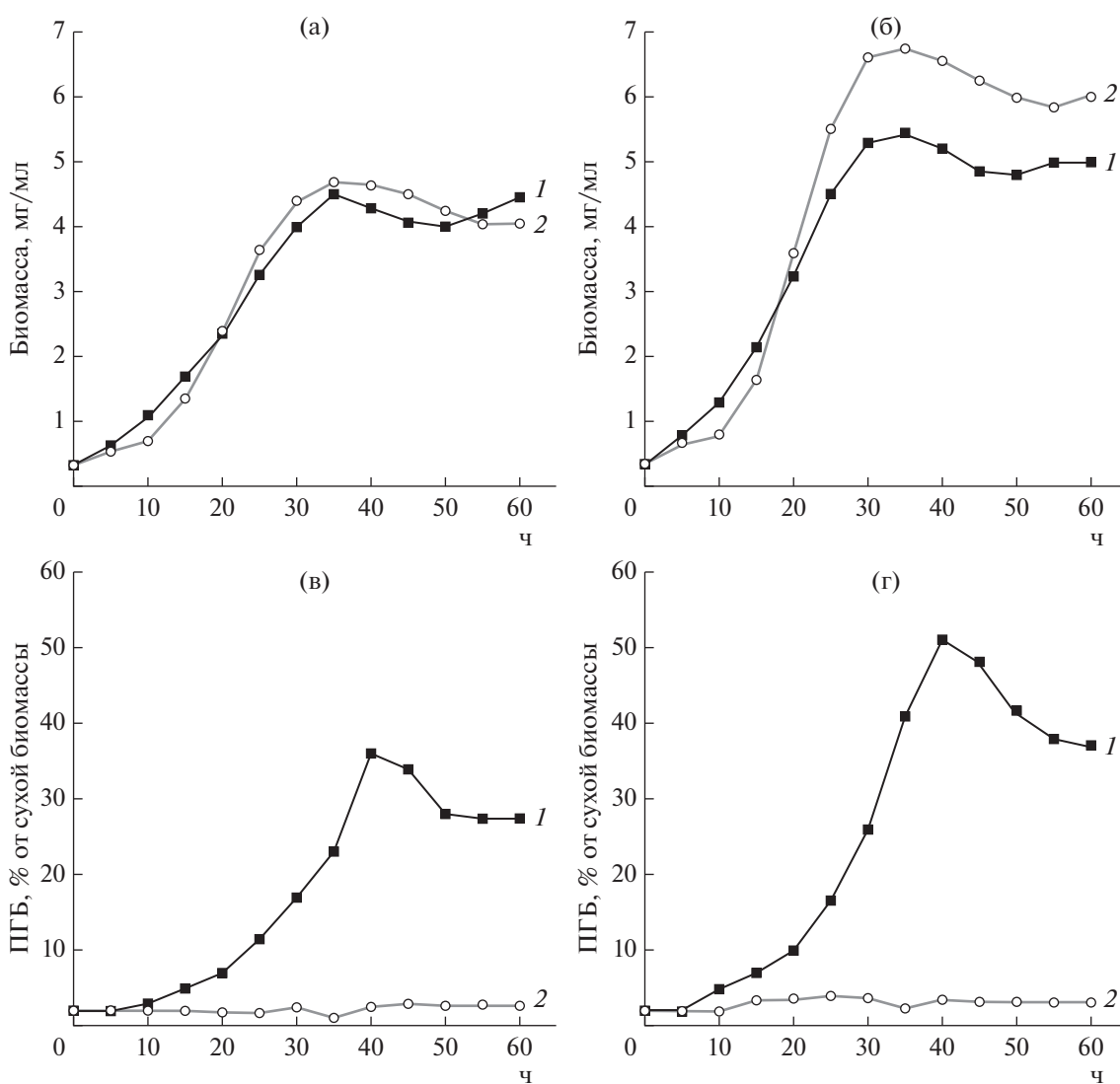


Рис. 2. Накопление биомассы (а, б) и ПГБ (в, г) клетками *R. phaseoli*, выращенными в аэробных условиях на среде № 1 (а) и № 2 (б). 1 – S-, 2 – R-форма.



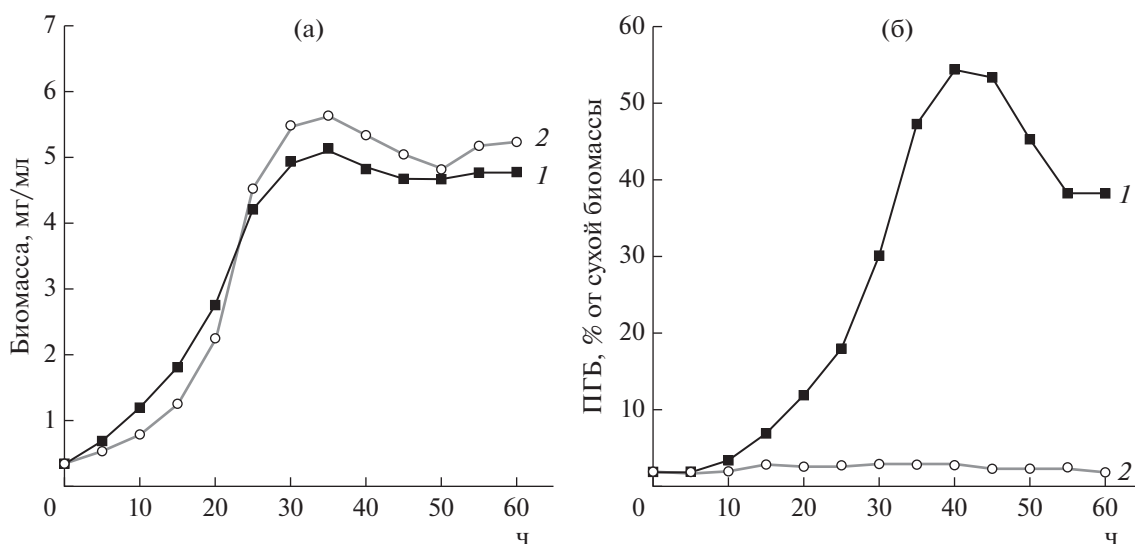


Рис. 3. Накопления биомассы (а) и ПГБ (б) клетками *R. phaseoli*, выращенными в микроаэрофильных условиях при культивировании на среде № 2. 1 – S-, 2 – R-форма.

да, а сам полимер является запасным веществом, накапливающимся при избытке углеродных субстратов.

При выращивании бактерий *R. phaseoli* были использованы аэробные и микроаэрофильные условия. Показано, что в микроаэрофильных условиях синтез ПГБ в клетках *R. phaseoli* увеличился ~ на 10% по сравнению с аэробными условиями, а содержание ПГБ могло достигать 54% от сухой биомассы (рис. 3). Во всех исследованных вариантах максимальное количество биомассы и максимум содержания ПГБ в клетках достигались к 35–40 ч роста.

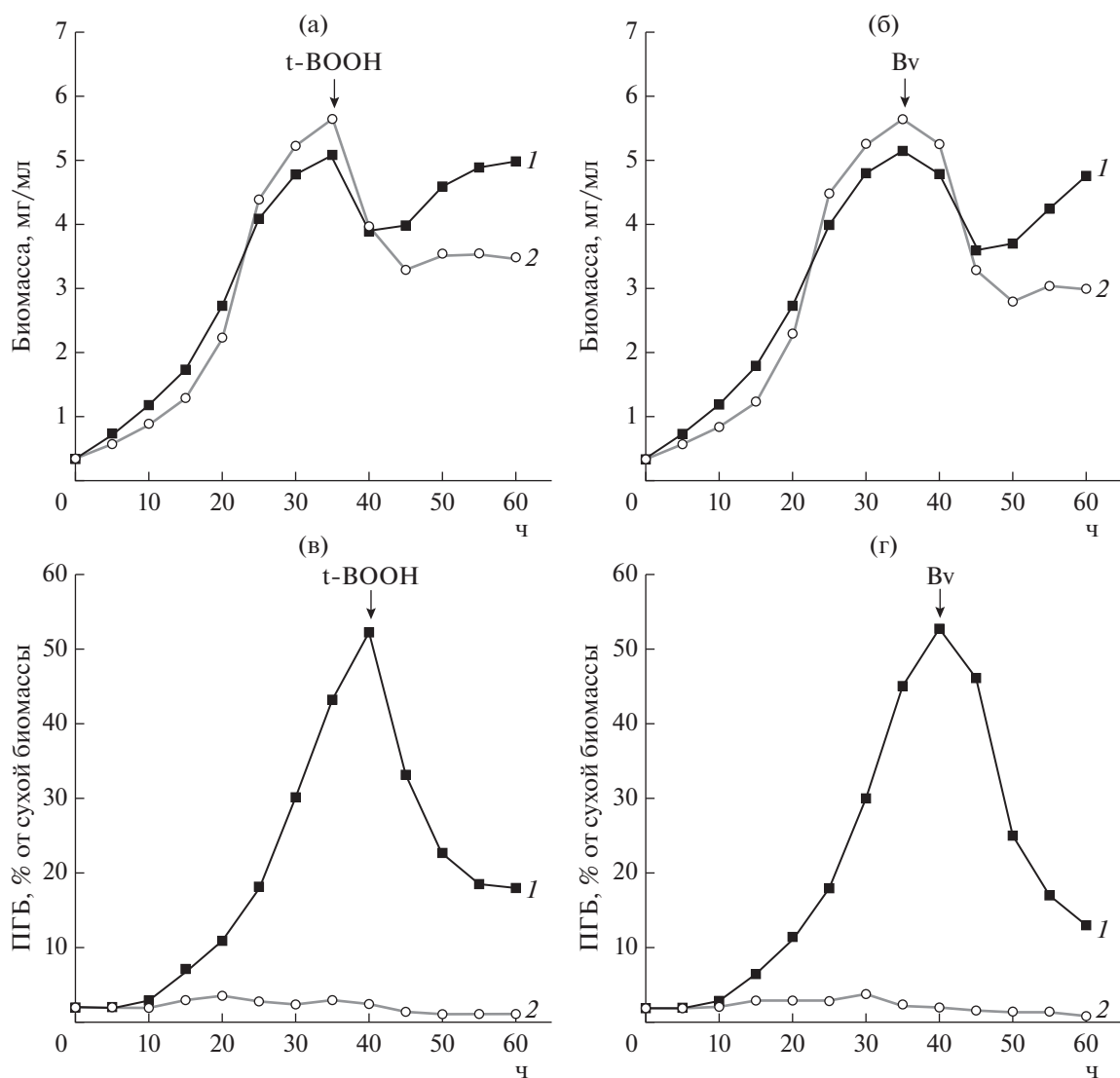
Изучено влияние окислительного стресса на рост бактерий *R. phaseoli*, синтезирующих ПГБ. В качестве индукторов окислительного стресса (прооксидантов) были использованы пероксид третбутила (t-BOOH) и бензилвиологен (Bv). Оба вещества негативно влияли на рост бактерий, и рост возобновлялся только у S-форм, синтезирующих ПГБ (рис. 4а, 4б) ~ через 6 ч после действия индукторов окислительного стресса. Еще через 10–12 ч биомасса S-формы вновь достигала максимального уровня. Необходимо отметить, что содержание самого полимера в клетках после действия t-BOOH и Bv резко падало и уже больше не восстанавливалось (рис. 4в, 4г). Таким образом, можно сделать вывод, что ПГБ являлся протектором для клубеньковых бактерий при окислительном стрессе.

Известно, что при низкой концентрации кислорода и высоком содержании углеводов клетки ризобий могут оказаться в состоянии редуцированного стресса – переполнение НАД(Ф)Н. Для его снижения может происходить активация мета-

болических путей, потребляющих восстановительные эквиваленты – синтез гликогена или ПГБ. За счет сброса электронов от НАД(Ф)Н на синтез ПГБ регенерируется НАД(Ф)<sup>+</sup>, и, тем самым, предотвращается ингибирование ферментов цикла Кребса – НАДФ<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) и цитратсинтазы (КФ 2.3.3.1) [16]. Другой протекторной функцией ПГБ для бактерий является мобилизация энергетических запасов на случай стрессовой ситуации, в том числе недостатка углеводов. Известно, что ПГБ может защищать клетку и от других стрессовых воздействий: теплового и осмотического шока, УФ-облучения, действия окислителей [12, 40].

ПГБ накапливается в клетках прокариот в условиях несбалансированного роста и выполняет функцию резервного вещества для запасаания углерода и энергии, подобно жиру, гликогену и крахмалу у животных и растений. Эти биополимеры обладают рядом специфических свойств, таких, как способность к биодеструкции и совместимость с живой тканью организма, что открывает большие возможности для их использования в практике [41–43]. Конечным продуктом биодegradации ПГБ в окружающей среде является вода и двуокись углерода, а в живом организме – 3-изомасляная кислота.

ПГБ и другие полигидроксиалканоаты могут найти и уже находят применение в медицине в качестве рассасывающихся шовных нитей, повязок, тампонов, пластин и стержней в ортопедии, а также как полимерная матрица для медикаментов длительного высвобождения [44–46]. Перспективным считается использование ПГА в качестве тары для хранения многих жидких и сыпу-



**Рис. 4.** Накопление биомассы (а, б) и ПГБ (в, г) клетками *R. phaseoli* при культивировании на среде № 2 в микроаэрофильных условиях при действии пероксида трет-бутила (а) и бензилвиологена (б). 1 – S-, 2 – R-форма.

чих веществ, в частности, одноразовых бутылок, банок, флаконов. Благодаря низкой проницаемости пленки из ПГА для кислорода, она может быть использована для упаковки пищевых продуктов. Одним из важнейших преимуществ производства биополимеров является возможность использования в качестве сырья постоянно воспроизводимых пищевых ресурсов, таких, как сахар и отходы его производства. Кроме того, захоронение изделий из ПГА после использования обеспечивает их полную биodeградацию и исключает загрязнение окружающей среды. Сам процесс биосинтеза также практически не дает побочных продуктов, производство ПГА является безотходным, поэтому экологический аспект этих разработок также очень важен [17].

Бактериальные ПГА рассматриваются как очень перспективные биоразлагаемые полимеры и изучаются их различные возможные продуценты [17]. В работе [47] в качестве источника мономеров для ПГА были рассмотрены виды еще одного рода клубеньковых бактерий – *Mezorhizobium*, выделенные из клубеньков *Lotus corniculatus*, причем синтез мономеров в этом случае являлся штамм-зависимым.

Как было отмечено выше, в наших опытах содержание ПГБ в клетках *R. phaseoli* в некоторых случаях могло достигать 54% от сухой массы клеток, что превышает максимальную для клубеньковых бактерий рода *Mezorhizobium* (штамм CSLC10N) величину 44%, как это описано в работе [47]. Такая величина близка значениям, харак-

терным для бактериальных штаммов-продуцентов полимера, использующихся в биотехнологии. Можно сделать заключение, что клубеньковые бактерии, выращенные в глубоинной культуре, могут быть потенциальными продуцентами ПГБ и других ПОА.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meyer A. *Praktikum der botanischen bakterienkunde*. Jena: G. Fischer, 1903. 157 s.
- Lemoigne M. // *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1926. V. 8. P. 770–782.
- Macrae R.M., Wilkinson J.R. // *J. Gen. Microbiol.* 1958. V. 19. P. 210–222.
- Schlegel H.G., Gottschalk G., Von Bartha R. // *Nature*. 1961. V. 191. № 4787. P. 463–465.
- Dawes E.A., Senior P.J. // *Adv. Microbiol. Physiol.* 1973. V. 10. P. 135–266.
- Slater S.C., Voige W.H., Dennis D.E. // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 10. P. 4431–4436.
- Schubert P., Steinbüchel A., Schlegel H.G. // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 12. P. 5837–5847.
- Peoples O.P., Sinskey A.J. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 26. P. 15293–15297.
- Poirier Y., Erard N., Petotot J.M.C. // *FEMS Microbiology Letters*. 2002. V. 207. № 1. P. 97–102.
- Lossl A., Eibl C., Harloff H.J., Jung C., Koop H.U. // *Plant Cell Reports*. 2003. V. 21. № 9. P. 891–899.
- Forsyth W.G.C., Hayward A.C., Roberts J.B. // *Nature*. 1958. V. 182. № 4638. C. 800–801.
- Романов В.И. // *Успехи биологической химии*. 1977. Т. 18. С. 211–230.
- Sutton W.D., Pankhurst C.E., Craig A.S. // *Intern. Rev. Cytol.* 1982. Suppl. 13. P. 149–177.
- Lodwig E., Poole P. // *Cr. Rev. Plant Sci.* 2003. V. 22. P. 37–78.
- Cevallos M.A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y., Mora J. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 1646–1654.
- Trainer M.A., Charles T.C. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 71. P. 377–386.
- Saharan B.S., Grewal A., Kumar P. // *Chinese J. Biology*. 2014. V. 2014. e802984.
- Романов В.В., Юшкова Л.А., Кретович В.Л. // *Микробиология*. 1975. Т. 44. № 5. С. 820–824.
- Федулова Н.Г., Черменская И.Е., Романов В.И., Кретович В.Л. // *Физиология растений*. 1980. Т. 27. № 4. С. 544–549.
- Topunov A.F. // *Biochemistry (Moscow)*. 1995. V. 60. № 1. P. 45–49.
- Topunov A.F., Petrova N.E. // *Russian J. Plant Physiol.* 1997. V. 44. № 5. P. 580–584.
- Topunov A.F., Rozov F.N., Petrova N.E. // *Russian J. Plant Physiol.* 1998. V. 45. № 6. P. 814–819.
- Layzell D.B., Atkins C. *The Physiology and Biochemistry of Legume N<sub>2</sub> Fixation*. // *Plant Metabolism*. /Ed. D.T. Dennis, D.H. Turpin, D.D. Lefebvre, D.B. Layzell. Singapore: Longman Singapore Publishers, 1997. P. 495–505.
- Stam H., van Verseveld H.W., de Vries W., Stouthamer A.H. // *FEMS Microbiology Letters*. 1986. V. 35. № 2–3. P. 215–220.
- Paganelli F.L., de Macedo Lemos E.L., Carareto Alves L.M. // *World J. Microb. Biot.* 2011. V. 27. № 4. P. 773–778.
- Madison L.L., Huisman G.W. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. P. 21–53.
- Law J.H., Slepecky R.A. // *J. Bacteriol.* 1961 V. 82. № 1. P. 33–36.
- Spiekermann P., Rehm B.H., Kalscheuer R., Baumeister D., Steinbüchel A. // *Arch. Microbiol.* 1999. V. 171. № 2. P. 73–80.
- Tyo K.E., Zhou H., Stephanopoulos G.N. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 3412–3417.
- Pinzon N.M., Aukema K.G., Gralnick J.A., Wackett L.P. // *mBio*. 2011. V. 2. № 4. e00109–11.
- Romanov V.I., Fedulova N.G., Tchernenskaya I.E., Shramko V.I., Molchanov M.I., Kretovich W.L. // *Plant Soil*. 1980. V. 56. № 3. P. 379–390.
- Manju J, Prabakaran P. // *International J. Engineering Science Invention*. 2015. V. 4. № 11. P. 23–28.
- Ji Eun Choi, Hye Young Na, Taek Ho Yang, Sung-Keun Rhee, Jae Kwang Song. // *AMB Express*. 2015. V. 5. P. e48.
- Hartman L. // *Staining Technology*. 1940. V. 15. P. 23–28.
- Jordan D.C. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982. V. 32. № 1. P. 136–139.
- Mateos P.F., Velázquez E., Igual J.M., Martínez-Molina E., Peix A., Trujillo M.E., Ramírez-Bahena M.H., Flores-Félix J.D., Alonso de la Vega P., Rivas R. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. № 4: P. 1213–1219.
- Weil E., Felix A. // *Wien. Klin. Wochenschr.* 1917. B. 30. S. 1509–1511.
- Israilski W., Starygin L. // *Zbl. Bacter. II*. 1930. B. 81. S. 1–11.
- Hadley P. // *Journal of Infectious Diseases*. 1927. V. 40. № 1. P. 1–312.
- Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 3244–3250.
- Byrom D. // *Trends in Biotechnol.* 1987. V. 5. № 9. P. 246–250.
- Piskin E. // *J. Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1995. V. 6. № 9. P. 775–795.
- Alejandra R.C., Margarita C.M., Soledad M.C.M. // *Polymer Degradation and Stability*. 2012. V. 97. № 11. P. 2473–2476.
- Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Босхонджиев А.П., Заиков Г.Е. // *Пластические массы*. 2010. № 3. С. 6–23.
- Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Воинова В.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018. № 6. С. 130–134.
- Bonartsev A.P., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Bonartseva G.A. // *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry*. 2011. V. 5. № 1. P. 10–21.
- Marcos-García M., García-Fraile P., Filipová A., Menéndez E., Mateos P.F., Velázquez E., Cajthaml T., Rivas R. // *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. V. 24. № 21. P. 17436–17445.

## Influence of Cultivation Conditions on the Synthesis of Poly-3-hydroxybutyrate by Nodulating Bacteria *Rhizobium phaseoli*

O. V. Kosmachevskaya<sup>a</sup>, E. V. Osipov<sup>a</sup>, Tran Van Chi<sup>b</sup>, Pham Thi Tuyet Mai<sup>b</sup>, and A. F. Topunov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup>*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen City, 251210 Vietnam*

\*e-mail: [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

Received July 09, 2019; revised August 20, 2019; accepted August 30, 2019

The synthesis of poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) in nodulating bacteria *Rhizobium phaseoli* in free-living culture was studied. The Law method for PHB identification was modified, what allowed to isolate and measure quantity of the polymer directly from the biomass. Only cells of *R. phaseoli* in S-form could synthesize PHB. Its accumulation on C-rich medium was ~50% more active, and the polymer granules were more clearly visible. PHB synthesis increased with decreasing aeration, and the maximum content was reached to 40–45 hours of growth. The influence of oxidative stress caused by *t*-buthyl hydroperoxide and benzylviologene on the growth of PHB-synthesizing bacteria was examined. Both compounds negatively influenced the bacterial growth, which regenerated only in S-form synthesizing PHB. It can be concluded that PHB protects nodulating bacteria at the oxidative stress conditions. The maximal PHB content in *R. phaseoli* cells reached 54% of the dry mass, what exceeds the values previously described for rhizobia. This amount is close to ones characteristic for bacterial strains – producers of the polymer, used in biotechnology. It is possible to make conclusion, that free-culture grown rhizobia can be potential producers of polyhydroxybutyrate and other polyhydroxyalkanoates.

**Keywords:** nodulating bacteria, *Rhizobium phaseoli*, poly-3-hydroxybutyrate, R and S bacterial forms, oxidative stress

УДК 577.114.5:616-097

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИЦЕЛИЯ И АНТИГЕНОВ РЯДА ВИДОВ МИКРОМИЦЕТОВ В ПОЧВЕННЫХ ЭКСТРАКТАХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

© 2020 г. А. Е. Иванова<sup>1,2,\*</sup>, А. С. Шутова<sup>1</sup>, А. В. Ганнесен<sup>3</sup>, Ю. С. Лебедин<sup>4</sup>, С. А. Ерёмин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Институт проблем эволюции и экологии им. А.Н. Северцова, РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>3</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

<sup>4</sup>ООО “ХЕМА”, Москва, 105264, Россия

\*e-mail: ivanovaane@gmail.com

Поступила в редакцию 24.12.2018 г.

После доработки 20.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Изучены 16 вариантов тест-систем (двухсайтовый сэндвич- и конкурентный иммуноферментный анализ) для определения в экстрактах почв концентрации антигенов микромицетов, некоторые из которых известны как условно-патогенные для человека. Проведена оценка корреляция количества биомассы грибов (длины растущего мицелия) и концентраций антигенов. Показано, что методы иммуноферментного анализа (ИФА) обладали высокой эффективностью при длительной (более 5 сут) инкубации образцов почвы для дорастивания микромицетов: количество антигенов, выявляемых данными методами, варьировало от 22 ед./мл (*Fusarium solani* F-142) до 540 ед./мл (*Aspergillus niger* F-273). Методы оказались малоэффективными при кратковременной инкубации, поскольку корреляции между увеличением длины гиф и количеством детектируемых антигенов в первые сутки культивирования не выявлено. Гифы грибов выросли в среднем на 20–25 мм (до 53 мм у *A. niger* F-273), тогда как количество выявляемых антигенов в первые сутки не изменялось относительно контроля. Показана перспективность обоих методов ИФА для детекции ряда почвенных микромицетов – представителей родов *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus* и *A. niger*), *Fusarium* (*F. solani* и *F. poae*), и др. (*Alternaria alternata*, *Phoma lingam* и *Mucor hiemalis*), при этом конкурентный ИФА оказался более эффективным.

**Ключевые слова:** почвенные микроскопические грибы, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, антиген, антитело

**DOI:** 10.31857/S0555109920010080

В настоящее время иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из наиболее широко применяющихся методов химической энзимологии [1]. Его отличает стабильность реагентов, простота методов регистрации и высокая чувствительность, позволяющая определять соединения в концентрациях  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  М [2]. Метод считается простым и удобным в использовании, поскольку накоплено множество данных по созданию реагентов и изучены основные закономерности протекания реакций [1]. ИФА применяется для исследования большого количества объектов в различных областях медицины, сельского хозяйства, пищевой и микробиологической промышленности. ИФА можно детектировать пестициды [3–5], в том числе в таких продуктах питания как рыба [6], овощи и фрукты [7, 8], мо-

локо [9], а также определять наличие компонентов технических смазок [11] и антибиотиков [10, 12].

С практической точки зрения для характеристики микробиома почвы наиболее интересно выявление патогенов человека, а также бактерий, улучшающих рост растений. В почвенной микробиологии используются прямой и непрямой методы флуоресцирующих антител, и эти методы хорошо себя проявили при изучении микробных популяций. Если говорить о бактериях, улучшающих рост растений, то метод ИФА использовался для детекции ризосферных микроорганизмов, например, клубеньковых рода *Rhizobium* [13–15], а также *Azospirillum* [16, 17] и актиномицетов в почве [18]. Были предприняты попытки выявления методом ИФА почвенных грибов – эндофитного *Lolium perenne* [19] и эндомикоризных грибов [20, 21]. Из

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

Вид	Номер штамма в коллекции	Место выделения штамма
<i>A. alternata</i>	F-34	Дерново-подзолистая почва, Москва
<i>A. fumigatus</i>	F-37	Почва серая лесная, погребенный горизонт А, Тульская обл.
<i>A. flavus</i>	F-293	Почва, пустошь, Архангельская обл.
<i>A. niger</i>	F-273	Серозем, горизонт А, пустыня Негев, Израиль
<i>F. poae</i>	F-145	Воздух, Москва
<i>F. solani</i>	F-142	Гуминовый препарат, жидкая подкормка для растений
<i>P. lingam</i>	F-80	Дерново-подзолистая почва, горизонт А, Москва
<i>M. hiemalis</i>	F-93	Воздух над урбаноземом, Москва

фитопатогенных микроорганизмов интерес представляют широко распространенные представители родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria* и *Phoma*, вызывающие не только различные заболевания растений, но и порчу растительных продуктов, синтезирующие микотоксины и хорошо сохраняющиеся в почве в виде спор. Некоторые из них могут быть патогенами человека [22–24].

Однако широкого распространения в почвенной микробиологии метод ИФА не получил по ряду причин. Одной из них являются высокие требования, предъявляемые к качеству реагентов, а также ограничение возможности увеличения чувствительности большинства имеющихся систем фоновым содержанием анализируемого соединения в почве, т.е. исследование малочисленных микроорганизмов и популяций часто оказывалось невозможным. Применение большинства существующих систем ИФА с флуоресцентной меткой имеет ряд ограничений, поскольку часто сложно обнаружить свечение изучаемых организмов из-за проявления неспецифической адсорбции флуоресцирующих антител почвенными частицами, тем более что серологическая реакция у разных микроорганизмов может сильно варьировать на уровне штаммов [25].

В то же время при модификации реагентов возможно применение метода ИФА как экспресс-метода при анализе почвенных суспензий, так как он позволяет проводить быстрое качественное выявление и количественную оценку присутствия экологически значимых видов грибов в почве. Применение данного экспресс-метода может быть востребовано при биоконтроле присутствия в разных субстратах и природных местообитаниях видов грибов, патогенных для самых разных групп организмов – растений, животных и человека. Применение метода ИФА актуально для конструирования почв с использова-

нием рекультивационных смесей и в биоконтроле состояния урбо- и агроэкосистем.

Цель работы – оценка возможности применения разработанных экспериментальных экспресс-тестов на основе ИФА для определения присутствия в образцах почвы ряда видов микромицетов, известных как фитопатогенные или потенциально патогенные для человека.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования и культивирование.** Для исследования компанией “Хема-Медика” (<http://xema-medica.com/>) были разработаны экспериментальные наборы для ИФА. Выбраны 8 видов почвенных грибов, которые включали *A. alternata* (Fries) Keissler, *A. fumigatus* Fresenius, *A. flavus* Link, *A. niger* Tieghem, *A. niger* (Peck) Wollenweber, *F. solani* (Martius) Saccardo, *P. lingam* (Tode) Desmazières и *M. hiemalis* Wehmer. Штаммы данных видов взяты из коллекции кафедры биологии почв факультета почвоведения Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (табл. 1).

В качестве субстрата использовали дерново-подзолистую почву парка Воробьевы горы в (Москва, Россия) с рН вод 6.3, содержащую 4% гумуса.

**Подготовка образцов.** Дерново-подзолистую почву, предварительно растертую в ступке до однородного состояния, для стерилизации трижды автоклавились с интервалами в несколько суток. Далее с использованием стерилизованной воды делали почвенную пасту, раскладывали ее по чашкам Петри диаметром 4 см. В 4 чашки вносили споровые суспензии, а 4 чашки оставляли без внесения спор в качестве контроля.

Споровые суспензии готовили смывом с чистых культур штаммов, выращенных в пробирках на скошенной среде Чапека в течение 7–8 сут.

Плотность вносимой споровой суспензии проверяли с помощью камеры Горяева. Для достижения концентрации  $10^5$ – $10^6$  спор/г почвы в чашки Петри вносили такой объем суспензии, чтобы масса сухой почвы в чашке оказалась равной 5 г. После внесения споры распределяли по объему почвы перемешиванием стерильной лопаткой. Перед началом инкубации отбирали почвенные пробы из чашек Петри с внесенной споровой суспензией и контрольных чашек. Из отобранных проб готовили материал для ИФА и делали посев почвенной суспензии для определения возможного присутствия каких-либо грибов в исходных почвах и контроля жизнеспособности внесенных спор. Для подбора оптимального времени инкубации осуществляли отбор почвенных проб для ИФА через 6, 9, 12, 24 и 120 ч после начала инкубации.

**Определение длины гиф методом мембранных камер.** Параллельно подготовке проб для ИФА проводили измерение длины гиф методом мембранных камер Хансена с модификациями [26] для контроля роста грибов в почве. Мембранные фильтры МФАС-ОС-1 (диаметр 35 мм, поры 0.22 мкм, “Владипор”, Россия) стерилизовали кипячением в дистиллированной воде в течение 10 мин и остужали. Затем на фильтры вносили по 50 мкл споровой суспензии ( $10^5$ – $10^6$  спор/мл) и накрывали сверху другим мембранным фильтром. Полученные мембранные камеры помещали в часть чашек Петри со стерилизованной почвой и инкубировали в закрытом эксикаторе при комнатной температуре.

Камеры поочередно извлекали через 6, 9, 12, 24 и 120 ч и отбирали пробы на ИФА. Осуществляли подсчет выросшего мицелия, чтобы выявить корреляцию между данными ИФА и длиной гиф. Для этого камеры раскрывали и помещали в стеклянные чашки Петри на предварительно размещенные на дне стерильные диски фильтровальной бумаги, смоченные в растворе красителя (1%-ный дианиловый голубой в 5%-ном феноле в соотношении 1 : 5). Окрашивали в течение 2–3 ч. Затем фильтры высушивали при комнатной температуре, размещали на предметные стекла и просветляли иммерсионным вазелиновым маслом. После обесцвечивания фильтры микроскопировали и определяли рост мицелия по длине проростков при помощи окуляр-микрометра. Для расчета длины гиф (мкм) анализировали не менее 10 полей зрения на каждом фильтре, после чего находили среднее значение длины гиф для каждого вида.

**Оценка влияния способов хранения почвенных проб на выявление микромицетов методом ИФА.** Почву, инокулированную спорами разных видов

грибов, и контрольные почвы инкубировали в эксикаторах при комнатной температуре в течение 5 сут. Затем отбирали почвы для проведения ИФА и сравнивали их со свежими почвами. При этом половину чашек убирали в морозильную камеру, а вторую половину накрывали крышками и высушивали при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, после чего проводили отбор проб для ИФА. При инокуляции видов *P. lingam*, *F. poae* и *M. hiemalis* почву для ИФА брали также на 2 сут инкубации для прослеживания динамики развития в них мицелия.

**Пробоподготовка образцов почв для проведения ИФА.** Навеску анализируемой почвы массой 1 г помещали в стерильные пластиковые пробирки со стерильной водой объемом 10 мл. Десорбцию клеток осуществляли на вортексе Heliford при 3500 об./мин в течение 3 мин. Затем частицы почвы в суспензии осаждали центрифугированием при 775 g (3400 об./мин) в течение 10 мин. Супернатант хранили в пробирках Eppendorf объемом 1.5 мл в морозильной камере.

**Конкурентный метод ИФА.** Анализ почв проводили в соответствии с инструкциями производителя наборов “Хема-Медика”. В рамку планшета с иммобилизованными антигенами помещали нужное количество стрипов или лунок из расчета 12 лунок для калибровочных проб и контрольных образцов и необходимое количество исследуемых образцов в 2 повторностях. Затем вносили в соответствующие лунки по 50 мкл проб для калибровки (0, 5, 20, 100 и 500 ед./мл определяемого антигена). В лунки, предназначенные для исследуемых образцов, вносили по 50 мкл супернатанта. Затем во все лунки вносили по 50 мкл раствора IgG кролика с пероксидазой против определяемых антигенов и перемешивали содержимое лунок осторожными круговыми движениями планшета в горизонтальной плоскости в течение 5–7 с, после чего заклеивали лунки пленкой для заклеивания планшетов. Планшеты инкубировали 60 мин при 37°C, затем стрипы промывали 3 раза отмывочным раствором, приготовленным путем разбавления концентрата в 26 раз. В отмытые лунки вносили 100 мкл конъюгата (иммуноглобулины овцы против IgG кролика с пероксидазой) и инкубировали 30 мин при 37°C, после чего отмывали 5 раз отмывочным раствором. Затем в лунки вносили 100 мкл раствора субстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ) и инкубировали 15 мин при 20–25°C. По истечении срока инкубации в лунки вносили по 100 мкл стоп-реагента (5.0%-ную  $H_2SO_4$ ) и измеряли оптическую плотность (ОП) при 450 нм.

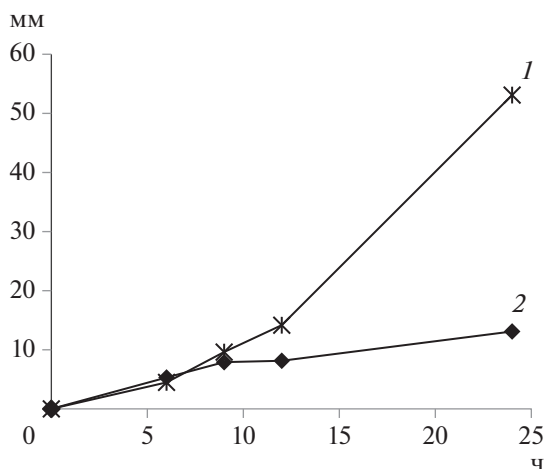


Рис. 1. Длина гиф грибов *A. niger* F-273 (1) и *P. lingam* F-80 (2), определенная методом мембранных камер.

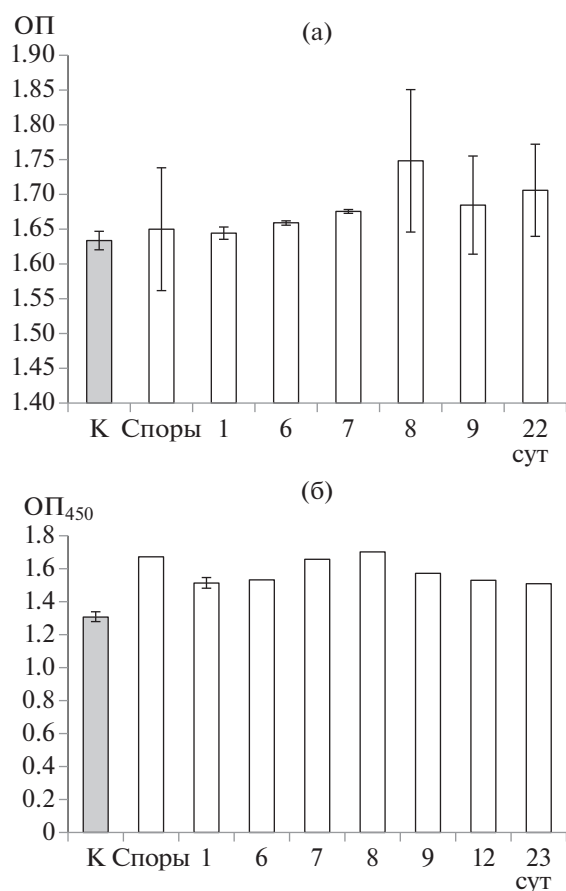


Рис. 2. Детекция антигенов грибов в экстрактах почвы методами ИФА в первые сутки роста *A. alternata* F-34 двухсайтовым сэндвич-методом (а) и *A. flavus* F-293 конкурентным методом (б).

**Метод двухсайтового сэндвич-ИФА.** Анализ образцов проводили по фабричному протоколу для коммерческого набора “Хема-Медика”. Протокол пробоподготовки до стадии отмывания включительно идентичен используемому для конкурентного ИФА. После отмывки в лунки вносили 100 мкл субстрата ТМБ, инкубировали 15 мин при 20–25°C, и реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента. ОП измеряли при 450 нм.

Для расчета значений в обоих методах использовали линеаризацию концентрационных зависимостей сигнала ИФА (оптической плотности), построенных в полулогарифмических координатах. Достоверность результатов проверяли построением калибровочной кривой и оценкой ее отклонения от линии тренда. Расчет концентраций по ОП осуществляли при помощи различных функций в программных пакетах Microsoft EXCEL и SlideWrite Plus 7.01.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Рост гиф в мембранных камерах.** Показано, что в первые сут культивирования длина гиф увеличивалась почти линейно. В среднем у восьми изученных штаммов к концу первых сут культивирования длина достигала 20–25 мм. Наибольшей скоростью роста гиф обладал штамм *A. niger* F-273, длина гиф которого к концу первых сут культивирования достигала в среднем 53 мм (рис. 1, 1). Наименьшей скоростью роста гиф обладал штамм *P. lingam* F-80 (рис. 1, 2), средняя длина гиф которого достигала лишь 13 мм после 24 ч культивирования в мембранных камерах.

**Аналитические параметры ИФА тест-систем.** Чувствительность определения составляла 5 ед./мл антигена *Aspergillus*. Для ИФА теста *Aspergillus* не обнаружено значимой перекрестной реакции (<0.1%) со следующими родами и видами: *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Thamnidium*, *Phoma*, *Alternaria*, *Fusarium*; *Trichoderma*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Ustilago*, *Botrytis*, *Geomyces*, *Ascochyta*, *Claviceps*, *Neurospora*, *Acremonium*, *Ophiostoma*; *Trichophyton* и *Microspora*. Чувствительность и специфичность других ИФА тест систем отличалась для различных видов грибов и соответствовала данным инструкции тест-набора.

**Детекция антигенов грибов методами ИФА в первые сутки культивирования.** Несмотря на то, что гифы всех грибов, изученных методом мембранных камер, росли линейно в течение первых суток культивирования, линейного роста антигенов, детектируемых методами ИФА, не было обнаружено (рис. 2). Значения, полученные при применении обоих методов (двухсайтовый сэнд-

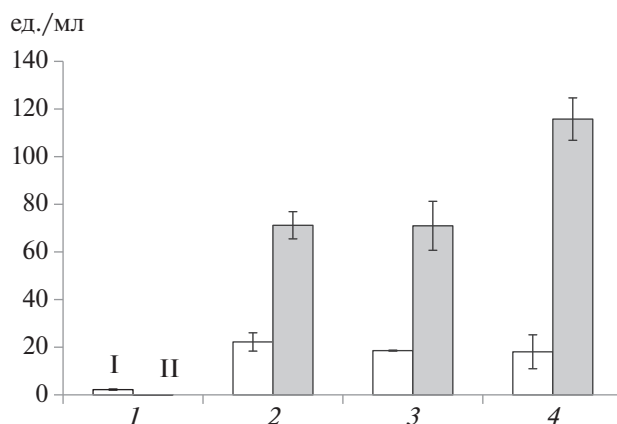


вич-ИФА и конкурентный ИФА), не отличались от контрольных и сильно варьировали. Например, если для *A. alternata* F-34 намечалась слабая тенденция к увеличению количества детектируемого антигена к концу первых суток культивирования по сравнению контролем (рис. 2а), то для *A. flavus* F-293 (рис. 2б) подобной тенденции не наблюдали. Таким образом, корреляции между детекцией грибов методами ИФА и длиной гиф в первые сутки культивирования не наблюдалось, что, вероятно, являлось следствием недостаточной выработки антигена грибами. Также это может быть свидетельством необходимости доработки системы. О необходимости доработки также говорил тот факт, что значение ОП<sub>450</sub> в образцах, куда споры были внесены, было близко к значению в контроле без внесения спор (рис. 2).

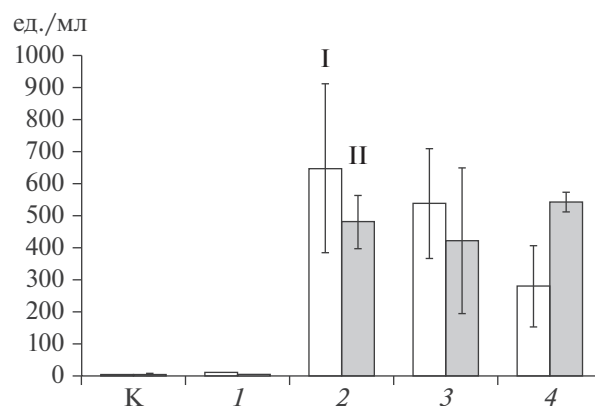
**Детекция грибов методами ИФА в образцах после длительной инкубации.** При дорастивании грибов количество детектируемых их антигенов незначительно изменялось за первые сутки, но после 5 сут инкубации наблюдался значительный прирост (рис. 3). При этом количество антигенов, детектируемое конкурентным методом, было выше, чем двухсайтовым сэндвич-методом. Это различие связано с использованием в двух методах разных препаратов антител. Наблюдали увеличение содержания антигена, детектируемого конкурентным ИФА, в высушенных *F. solani* F-142. После 5 сут инкубации средняя концентрация антигена, детектируемая сэндвич-методом, была 22 ед./мл (рис. 3а), а детектируемая конкурентным методом – 72 ед./мл (рис. 3б). Заморозка или высушивание образцов, как правило, не влияли на количество детектируемого антигена, хотя в ряде случаев вызывали его увеличение.

В отличие от *F. solani* F-142 особенности *A. flavus* F-293 не позволяли детектировать его даже после инкубации в течение 5 сут. Это могло быть связано как с недостаточным синтезом антигена данным штаммом, так и потенциальными недостатками тестовой системы. При этом штаммы *A. niger* F-273 и *A. fumigatus* F-37 детектировались лучше всего (рис. 4). Так, концентрация антигенов *A. niger* F-273, выявленная конкурентным методом, была в среднем равна 540 ед./мл (рис. 4), а концентрация антигенов *A. fumigatus* F-37, выявленная сэндвич-методом, – в среднем 480 ед./мл.

В случае *F. poae* F-145 (рис. 5) при помощи обоих методов ИФА значительное увеличение концентрации антигена в почве наблюдали уже после 2 сут культивирования. Сэндвич-метод (рис. 5) оказался менее эффективен, нежели конкурентный (рис. 5), и позволил определить 16 и 56 ед./мл антигена соответственно.

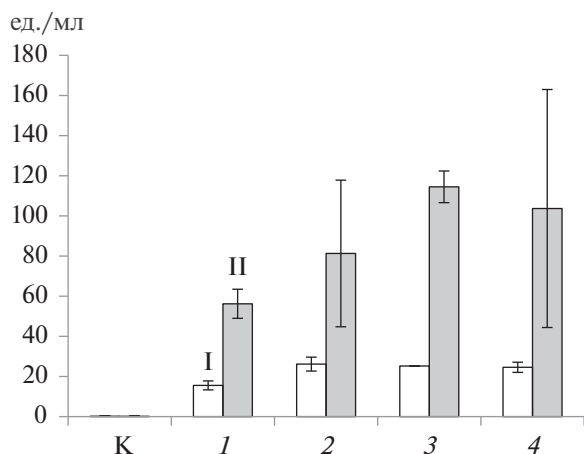


**Рис. 3.** Детекция антигенов (ед./мл) грибов *F. solani* F-142 двухсайтовым сэндвич- (I) и конкурентным методами (II) ИФА в экстрактах почвы после 6 сут инкубации: 1 – споры; 2 – образец на 6 сут; 3 – образец после заморозки; 4 – образец после высушивания.



**Рис. 4.** Детекция антигенов грибов *A. niger* F-273 конкурентным методом (I), *A. fumigatus* F-37 – двухсайтовым сэндвич-методом ИФА (II) в экстрактах из почв после 6 сут инкубации: К – контроль; 1 – споры; 2 – свежий образец на 6 сут; 3 – образец после заморозки; 4 – образец после высушивания.

В целом данные, полученные методами ИФА, коррелировали друг с другом. Несмотря на некоторые неточности, оба метода подтвердили перспективность для качественного и количественного определения антигенов патогенных грибов в почве. В будущем необходимо будет проверить точность и чувствительность разных способов анализа, усовершенствовать количественную оценку получаемых результатов, что довольно затруднительно вследствие сложности морфологии грибов, присутствующих в природе в виде спор и мицелия. Существуют также некоторые сложности при получении антигенов, поскольку организм животных-продуцентов не реагирует или слабо



**Рис. 5.** Детекция антигенов *F. poae* F-145 в экстрактах почв двухсайтовый сэндвич- (I) и конкурентным (II) методами ИФА после 6 сут инкубации: К – контроль; 1 – споры; 2 – свежий образец на 6 сут; 3 – образец после заморозки; 4 – образец после высушивания.

реагирует на введенный им грибной антиген. Это отчетливо видно на примерах *A. niger* F-273, *A. fumigatus* F-37 и *A. flavus* F-293. Тем не менее, в данной работе получены убедительные положительные результаты при использовании экспериментальных тест-систем, что позволяет рассматривать ИФА как перспективный метод определения экологически значимых для человека видов (условных патогенов, аллергенов и патогенов культурных растений). В частности, проведена апробация и показана эффективность экспериментальных иммуоферментных тест-систем для экспрессной детекции патогенов сельскохозяйственных растений *A. fumigatus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор RFME-FI60717X0185 проекта “Разработка тест-систем для экспрессной иммуодетекции фитопатогенных грибов в зерновых культурах и создание предпосылок для их успешной коммерциализации в России и на внешних рынках”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu L., Li G., Xu X., Zhu L., Huang R., Chen X. // Trends Anal. Chem. 2019. V. 113. P. 140–156.
2. Omori A.M., Ono E.Y.S., Hirozawa M.T., de Souza Sugiura I.M., Hirooka E.Y., Pelegrinelli Fungaro M.H., Ono M.A. // Toxins. 2019. V. 11. Article 48.
3. Schlaeppi J.M., Foery W., Ramsteiner K. // J. Agric. Food Chem. 1989. V. 37. № 6. P. 1532–1538.
4. Hollaway K.L., Kookana R.S., McQuinn D.J., Moerk-erk M.R., Noy D.M., Smal M.A. // Weed Res. 1999. V. 39. № 5. P. 383–397.
5. Xu Z.-L., Wang H., Shen Y.-D., Nichkova M., Lei H.-T., Beier R.C., Zheng W.-X., Yang J.-Y., She Z.-G., Sun Y.-M. // Analyst. 2011. V. 136. № 12. P. 2512–2520.
6. Sapozhnikova Y., Simons T., Lehotay S.J. // J. Agric. Food Chem. 2015. V. 63. № 18. P. 4429–4434.
7. Xu Z.-L., Deng H., Deng X.-F., Yang J.-Y., Jiang Y.-M., Zeng D.-P., Huang F., Shen Y.-D., Lei H.-T., Wang H., Sun Y.-M. // Food Chem. 2012. V. 131. № 4. P. 1569–1576.
8. Qian G., Wang L., Wu Y., Zhang Q., Sun Q., Liu Y., Liu F. // Food Chem. 2009. V. 117. № 2. P. 364–370.
9. Rengasamy P. T., Kantharimuthu A., Balaraman M., Sivanesan S. // African J. Food Sci. 2016. V. 10. № 3. P. 41–47.
10. Li C., Zhang Y., Eremin S.A., Yakup O., Yao G., Zhang X. // Food Chem. 2017. V. 227. № 1. P. 48–54.
11. Johnson J.C., Van Emon J.M. // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 1. P. 162–169.
12. Aga D.S., O'Connor S., Ensley S., Payero J.O., Snow D., Tarkalson D. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 18. P. 7165–7171.
13. Лисичкина Г.А., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 4. С. 646–650.
14. Кириллова Н.П., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. // Микробиология. 1984. Т. 53. № 1. С. 117–122.
15. Fuhrmann J., Wollum A.G. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. № 4. P. 1010–1013.
16. Лукин С.А., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. // Сельскохозяйственная биология. 1987. № 1. С. 51–58.
17. Krol M.J., Bashan Y., González L.E. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. № 2. P. 262–266.
18. Efremenkova L., Kozhevina P., Zvyagintsev D. // Microbiology. 1978. V. 47. № 6. P. 916–918.
19. Musgrave D.R. // New Zealand J. Agric. Res. 1984. V. 27. № 2. P. 283–288.
20. Wright S.F., Morton J.B., Sworobuk J.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 9. P. 2222–2225.
21. Aldwell F.E.B., Hall I. R., Smith J.M.B. // Soil Biol. Biochem. 1983. V. 15. № 3. P. 377–378.
22. Ганнибал Ф.Б. Токсигенность и патогенность грибов рода *Alternaria* злаков / Ред. Дмитриева А.П. Лаборатория микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского ВИЗР. История и современность. СПб: ВИЗР, 2007. С. 82–93.
23. Марфенина О.Е., Бубнова Е.Н., Семенова Т.А., Иванова А.Е., Данилогорская А.А. // Микология и фитопатология, 2014. Т. 48. № 3. С. 10–24.
24. Кулько А.Б. // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95. № 3. С. 54–60.
25. Richardson M.D., Page I.D. // Medical Mycology. 2016. V. 55. № 1. P. 48–55.
26. Hanssen J.F., Thingstad T.F., Goksøyr J. // Oikos. 1974. V. 25. № 1. P. 102–107.

## Determination of the Mycelium and Antigens of a number of Micromycetes in Soil Extracts by the Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

A. E. Ivanova<sup>a, b, \*</sup>, A. S. Shutova<sup>a</sup>, A. V. Gannesen<sup>c</sup>, Y. S. Lebedin<sup>d</sup>, and S. A. Eremin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>b</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

<sup>c</sup>*Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Science, 117312 Moscow, Russia*

<sup>d</sup>*XEMA Company Limited, Moscow, 105264 Russia*

\*e-mail: [ivanovaane@gmail.com](mailto:ivanovaane@gmail.com)

Received December 24, 2018; revised August 20, 2019; accepted August 30, 2019

A study was conducted on the effectiveness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods for the determination in soil extracts of a number of microfungi, some of them are known as opportunistic pathogens for humans. The correlation of the amount of fungal biomass (the length of growing mycelium) with the concentrations of antigens detected by the two-site sandwich ELISA method and the competitive ELISA method was evaluated. It has been shown that the methods are highly effective in the case of long incubation (more than 5 days) of soil samples and are ineffective in short-term incubation, because there was no correlation between length of hyphae and antigen concentrations during the first day of cultivation. The perspective of ELISA methods for the detection of some soil microfungi from genera *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. niger*), *Fusarium* (*F. solani*, *F. poae*) and other (*Alternaria alternata*, *Phoma lingam*, *Mucor hiemalis*) was shown. Competitive ELISA method was more efficient than two-site sandwich ELISA.

*Keywords:* soil microfungi, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, antigen, antibody

УДК 582.284.51:577.115

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОГО СУБСТРАТА И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ, БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ ЭКСТРАКТОВ *Stagonospora cirsii* S-47

© 2020 г. А. О. Берестецкий<sup>1</sup>, \*, М. Ю. Белозерова<sup>1</sup>, Д. С. Прокофьева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, С.-Петербург, 196608 Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., п. Кузьмоловский, 188663 Россия

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

Поступила в редакцию 27.02.2019 г.

После доработки 01.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Для определения токсигенного потенциала микогербицида на основе гриба *Stagonospora cirsii* S-47 исследовали влияние состава твердых и жидких питательных субстратов на выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из культур этого микромицета, а также спектр биологической активности и хроматографические профили полученных экстрактов. Максимальный ВЭВ из культурального фильтрата (около 250 мг/л) был получен через 2 нед. культивирования *S. cirsii* S-47 на жидкой питательной среде с соевой мукой. Такое же время инкубации было необходимо для получения максимального ВЭВ (около 1.5 г/кг) при культивировании гриба на перловой крупе. Экстракты из культуральных фильтратов проявляли более широкий спектр биологической активности, по сравнению с экстрактами из твердофазных культур *S. cirsii* S-47. Максимальная фитотоксическая и антибиотическая активность обнаружена у экстракта (экстрагент – хлористый метилен) трехнедельной культуры гриба на жидкой модифицированной среде Чапека, в таком же экстракте двухнедельной культуры обнаружена антиэстеразная активность. Цитотоксическую активность в отношении линии опухолевых клеток линии U251 проявлял экстракт (экстрагент этилацетат) из культурального фильтрата трехнедельной культуры гриба на жидкой среде ДМГ. Способ культивирования, а также состав питательной среды оказывали существенное влияние на набор продуцируемых грибом метаболитов.

**Ключевые слова:** *Stagonospora cirsii*, фитотоксичность, антимикробная активность, цитотоксичность, метаболиты грибов, стагонолид, гербарумин I, микогербицид

DOI: 10.31857/S0555109920010031

Биологические и биорациональные гербициды – это препараты для борьбы с сорными растениями на основе соответственно фитопатогенных микроорганизмов и их метаболитов. Токсикологические аспекты их применения, в том числе, селективность гербицидного действия, спектр биологической активности, экологическая безопасность, еще недостаточно изучены [1]. При этом хорошо известно, что многие фитопатогенные грибы являются продуцентами фитотоксинов и микотоксинов, которые могут обладать как широким, так и узким спектром биологической активности [2].

В настоящее время известны грибы родов *Fusarium* и *Myrothecium*, патогенные для сорных растений, экстракты которых обладают гербицидной активностью, однако их применение еще весьма

ограничено. Это связано с возможностью образования этими микромицетами микотоксинов, таких как трихотецены, которые могут нанести вред окружающей среде [3–8]. Однако, например, очищенный экстракт из культуральной жидкости *Ascochyta caulina* – потенциального микогербицида против мари белой, содержащий три полярных фитотоксина, обладал меньшей общей токсичностью в отношении рыб, водорослей, земляных червей, чем стандартные химические гербициды. В то же время высокочувствительной к нему оказалась дафния (*Daphnia magna*) на уровне 3 класса острой токсичности и 2 класса – хронической [9]. Эльсинохром А – основной токсический компонент экстрактов из культур патогена вьюнка полевого гриба *Stagonospora convolvuli*, обладал значительными антимикробными и цитотоксиче-

скими свойствами, однако не обнаруживался в обработанных микогербицидом растениях [10–12]. Аналогичные исследования проводятся и в отношении продуцентов микоинсектицидов и их метаболитов [13, 14].

Эти и многие другие работы не учитывают, что в изменяющихся условиях культивирования или в природе микроорганизмы—продуценты биоестицидов могут образовывать не только анализируемые в лабораторных условиях, но и совершенно иные метаболиты [15]. С целью выявления новых метаболитов микроорганизмов и уточнения их токсичности возможно использование подхода “один штамм — много метаболитов”. Он основан на том, что с помощью изменения состава среды и способа культивирования можно существенно влиять на образование вторичных метаболитов грибов и получать из одного продуцента различные по структуре и свойствам соединения. Примером может служить гриб *Ascochyta agropyri-na* var. *nana*, который при выращивании на перловой крупе образовывал папирацилловую кислоту [16], а на жидкой среде — другие фитотоксины — агропиренол и агропиренал [17]. Дрожжевой экстракт, который входит в состав многих жидких питательных сред, полученный от различных производителей, оказывал существенное влияние на количественный и качественный состав метаболитов, образуемых некоторыми штаммами грибов рода *Fusarium* [18]. На твердых субстратах изменения в составе токсинов *Fusarium* spp. были не столь значительными [19].

В качестве потенциального продуцента микогербицида интересен гриб *Stagonospora cirsii*. Штамм VIZR 1.42 этого гриба был изолирован из листьев бодяка полевого (*Cirsium arvense*) и предложен для биологической борьбы с этим сорняком [20]. Заявлен способ его применения в виде измельченного глубинного мицелия совместно с гербицидом глифосат, что позволяет значительно снизить норму расхода последнего для эффективного уничтожения бодяка [21]. Из больных листьев осота полевого (*Sonchus arvensis*), который наряду с бодяком полевым является широко распространенным и трудноискоренимым многолетним сорным растением, собранных в различных регионах Российской Федерации, были выделены несколько новых изолятов *S. cirsii* [22].

Гриб *Stagonospora cirsii* J.J. Davis, штамм С-163 (VIZR 1.41), выделенный из больных листьев бодяка полевого, оказался продуцентом биологически активных веществ (БАВ) из группы 10-членных макролидов (ноненолидов). Из культурального фильтрата этого гриба был выделен фитотоксин стагонолид А, который в концентрации ~1.0 мМ вызывает некрозы на листьях различных растений и достоверно ингибирует рост корешков проростков бодяка и салата в концентрации ~1.0 мкМ [23].

Этот токсин проявлял антимикробную активность в отношении *Candida tropicalis*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* при концентрации 100 мкг/диск. Структурно близок к нему гербарумин I, который выявлен у *Phoma herbarum* и был синтезирован из стагонолида А восстановлением карбонильной группы [23]. Этот фитотоксин ингибировал рост корешков *Amaranthus hypochondriacus* в микролюлярных концентрациях (ИК<sub>50</sub> = 50 мкМ) [24]. Из твердофазной культуры *S. cirsii* С-163 на пшене были выделены стагонолиды В–Н и модиолид А [25, 26]. Из них фитотоксическими свойствами обладали стагонолид Н и модиолид А, которые вызывали некрозы на листьях бодяка в минимальной концентрации ~1.0 мМ и 10 мМ соответственно. При этом было показано, что стагонолид Н (из других грибов был выделен как курвулид В1/В2) не проявлял ни антимикробной, ни цитотоксической активности [27, 28]. Модиолид А, выделенный из твердофазной культуры *S. cirsii* С-163 и некоторых других грибов, демонстрировал антимикробную активность в отношении *Micrococcus luteus* и *Neurospora crassa* в минимальной ингибирующей концентрации около 15–30 мкг/мл [29], а также *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* при 3–12 мкг/мл [30]. Однако в других тестах некоторые мицелиальные грибы и виды бактерий, устойчивых к антибиотикам, были к нему нечувствительными [27, 31]. Синтетический стагонолид F обладал умеренной цитотоксичностью на линиях клеток ТНР-1 and U-937 (ИК<sub>50</sub> около 35 мкг/мл) и слабыми антимикробными свойствами [32]. Цитотоксичность гербарумина I не изучена, однако его региомер обладал слабой цитотоксической и антимикробной активностью [33]. Наряду со многими другими соединениями из группы ноненолидов все перечисленные выше метаболиты, образуемые *S. cirsii*, к настоящему моменту синтезированы [34, 35].

В представленной работе мы использовали штамм S-47 *S. cirsii*, выделенный из листьев осота полевого. С целью изучения токсигенного потенциала этого гриба проведена оценка фитотоксической, антимикробной, цитотоксической и антиэстеразной активности его экстрактов в зависимости от состава питательных сред, способа и сроков культивирования.

## МЕТОДИКА

**Штамм гриба и его культивирование.** В работе мы использовали штамм S-47 *S. cirsii*, выделенный из осота полевого (*Sonchus arvensis*), собранного на юго-востоке Алтайского края. Штамм хранится в коллекции Лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

В качестве посевного материала использовали двухнедельную культуру гриба, полученную на стандартной агаризованной картофельно-сахарозной среде.

Для жидкофазного культивирования гриба использовали три жидкие среды (г/л): СС (сахароза – 60, соевая мука – 15,  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5,  $KH_2PO_4$  – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0; модифицированная среда Чапека с витаминами (ЧАВ, сахароза – 45,  $NaNO_3$  – 3,  $KH_2PO_4$  – 1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5,  $KCl$  – 0.5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.01, тиамин – 100 мкг, биотин – 5.0 мкг); ДМГ (дрожжевой экстракт – 4; мальтозный экстракт – 10; глюкоза – 10), рН доводили до 6.0. В конические колбы на 500 мл вносили по 100 мл жидкой питательной среды.

Для твердофазного культивирования готовили субстраты на основе перловой, пшеничной и рисовой круп. В конические колбы на 100 мл вносили 15 г крупы и 10 мл водопроводной воды, перемешивали и стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения субстрата колбы встряхивали для предотвращения его слипания.

Инокуляцию жидких и твердых субстратов проводили двумя агаровыми блоками, вырезанными из края колонии посевной культуры гриба. *S. cirsii* выращивали в течение 3 нед. при 24°C. Колбы с твердыми субстратами встряхивали каждые 2 дня, чтобы избежать их комкования.

**Получение экстрактов.** Метаболиты *S. cirsii* извлекали из культурального фильтрата (100 мл) последовательной экстракцией хлористым метиленом и этилацетатом (двумя порциями по 75 мл). Экстракты обезвоживали фильтрованием через безводный сернокислый натрий. Растворители отгоняли на ротационном испарителе при 40°C, сухой остаток объединенных экстрактов взвешивали.

Экстракцию метаболитов из твердофазных культур *S. cirsii* на зерновых субстратах проводили в два этапа. Высушенный биоматериал (5 г) измельчали в лабораторной мельнице, заливали 100 мл 50%-ного водного ацетона и обрабатывали ультразвуком 5 мин. Полученный экстракт фильтровали в испарительную колбу, после чего повторяли извлечение грибных метаболитов. Из объединенных экстрактов отгоняли ацетон, после чего метаболиты переэкстрагировали вновь последовательно n-гексаном (как стадия обезжиривания), хлористым метиленом и этилацетатом (каждым двумя порциями по 75 мл).

**Оценка биологической активности.** Для исследования фитотоксичности экстрактов использовали хорошо развитые листья осота полевого *Sonchus arvensis* (осот полевой, сем. Asteraceae) и *Elytrigia repens* (пырей ползучий, сем. Poaceae). Для оценки фитотоксической активности исследуе-

мый образец сначала растворяли в небольшом количестве этанола и доводили до необходимой концентрации дистиллированной водой, чтобы содержание этанола в растворе составляло 5%. Фитотоксичность 0.5%-ных экстрактов определяли методом листовых дисков [36]. Из листьев 3–5-недельных растений осота пробочным сверлом вырезали диски 1 см в диаметре; листья пырея нарезали на отрезки длиной около 2 см. Высечки и отрезки листьев растений помещали во влажную камеру. Каждую высечку в центре надкалывали острой препаровальной иглой, в область накола наносили 10 мкл исследуемого раствора. Определение диаметра некрозов для осота и длину некроза для пырея проводили через 48 ч инкубации при температуре 24°C и переменном искусственном освещении по 12 ч в день.

Антибиотическую активность полученных экстрактов в концентрации 500 мкг/диск оценивали на 3 тест-микроорганизмах (*Escherichia coli*; *Bacillus subtilis* и *Candida tropicalis*) методом бумажных дисков.

Для оценки цитотоксической активности экстрактов использовали клеточные линии аденокарциномы легких человека A549 и глиобластомы человека U251. Время экспозиции клеток с растворами экстрактов составляло 48 ч. Количество общего белка в лунках с клетками в качестве показателя прироста клеточной массы после воздействия исследуемых экстрактов определяли методом окраски с сульфородаминоном Б в соответствии с протоколом производителя (TOX6, “Sigma”, США) [14].

Оценку ингибирующего действия экстрактов по отношению к карбоксилэстеразе (КЭ) и бутирилхолинэстеразе (БХЭ) проводили как описано в работе [14] с незначительными модификациями [37, 38].

**Хроматографический анализ экстрактов.** Для анализа экстрактов методом тонкослойной хроматографии сухой остаток растворяли в ацетоне до концентрации 10 мг/мл. На линию старта пластин для ТСХ (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, “Merck”, Германия) наносили 5 мкл экстракта. Элюирование экстрактов проводили в системе растворителей гексан–этилацетат 1 : 1 (об./об.). Хроматограммы визуализировали при 254 нм и обработкой реагентом (анисовый альдегид–серная кислота–этанол 5 : 5 : 95, масса/об./об.) с последующим нагревом при температуре 120°C в течение нескольких минут до проявления полос. Учитывали хроматографическую подвижность полос и их цвет.

Для анализа экстрактов методом ВЭЖХ сухой остаток растворяли в ацетонитриле до концентрации 5 мг/мл. Разделение экстрактов производили на колонке Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 50 мм с размером частиц 1.7 μм с помощью хроматографической системы Acquity UPLC H-Class (“Wa-

ters”, США), снабженной диодно-матричным детектором (СВЭЖХ/ДМД). Объем вводимой пробы составлял 2 мкл. Элюирование экстрактов осуществляли при скорости потока элюента 300 мкл/мин и температуре колонки 40°C в системе ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота в градиентном режиме: от 10 до 100% ацетонитрила в течение 5 мин, затем 2 мин – 100% ацетонитрила. Детектирование веществ производили сканированием в диапазоне 190–600 нм при помощи функции MaxPlot программы Empower (“Waters”, США). Учитывали время удерживания и УФ-спектр мажорных соединений (уровень поглощения не менее 0.2). В этих условиях время удерживания ( $t_R$ ) стандартов составляло: 1.7 и 1.8 мин (стагонолид Н = курвулид В1/В2,  $\lambda_{\text{макс}} < 200$  нм), 3.1 мин (гербарумин I,  $\lambda_{\text{макс}} < 200$  нм), 3.3 мин (стагонолид А,  $\lambda_{\text{макс}} 234$  нм). Варьирование  $t_R$  в ходе экспериментов не превышало 5%. Указанные вещества были получены из культуры *S. cirsi* S-163, их структура подтверждена спектральными данными:  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-, УФ-спектроскопия и масс-спектрометрия [23–26].

**Статистический анализ.** Эксперименты проведены в 3–6 повторностях. Дисперсионный анализ данных проводили с помощью программы Statistica 8. Средние значения сравнивали на основании критерия наименьшей существенной разницы НСР при  $p = 0.05$  [39]. Кластерный анализ методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) проведен с целью сравнения различий экстрактов по хроматографическим профилям на базе матрицы, построенной на основе наличия или отсутствия метаболитов (следовые их количества не учитывали) с определенным временем удерживания и УФ-спектром.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Продуктивность.** Дисперсионный анализ полученных результатов показал, что различные крупы, входящие в состав твердого питательного субстрата, и сроки культивирования не оказывали существенного влияния (при  $p = 0.05$ ) на выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из твердофазных культур *S. cirsi* S-47. Не было существенным и взаимодействие этих факторов. Выбор экстрагента и его взаимодействия с вышеуказанными факторами были достоверными на уровне  $p < 0.01$ . Максимальный ВЭВ был достигнут при экстракции метаболитов гексаном из культуры *S. cirsi* S-47 на пшене (выход ~850 мг/кг), а также хлористым метиленом (выход 620–650 мг/кг) и из двухнедельных культур гриба независимо от состава твердого питательного субстрата (табл. 1). Максимальный суммарный ВЭВ (1.5 г/кг) был получен в результате последовательной экстракции грибных метаболитов тремя растворителями различ-

ной полярности из двухнедельной культуры *S. cirsi* на перловой крупе (табл. 1).

Состав жидкой питательной среды и сроки культивирования оказывали существенное влияние ( $p < 0.001$ ) на выход биомассы *S. cirsi* S-47, который варьировал от 1.7 до 25 г/л. Наиболее благоприятной для роста мицелия была среда СС: через 2 нед. культивирования наблюдали максимальный для эксперимента выход биомассы. Через 1 нед. культивирования гриба на среде СС дальнейшее прироста биомассы не наблюдали. При росте *S. cirsi* S-47 на средах ДМГ и ЧАВ рост биомассы гриба продолжался и на третьей неделе инкубации. Через 3 нед. культивирования выход мицелия гриба увеличивался в 3.6 раза на среде ДМГ и в 2.7 раза – на среде ЧАВ по сравнению со второй неделей (табл. 2).

Состав жидкой питательной среды и экстрагент оказали существенное влияние ( $p < 0.001$ ) на ВЭВ из культурального фильтрата *S. cirsi* S-47, тогда как влияние сроков культивирования на этот показатель не было достоверным (при  $p = 0.05$ ). Без учета продолжительности культивирования и экстрагента средний ВЭВ из культур гриба на среде СС был в 2 раза выше, чем на среде ДМГ и в 6 раз выше, чем на среде ЧАВ. При последовательной экстракции грибных метаболитов из культурального фильтрата *S. cirsi* S-47 растворителями различной полярности при использовании хлористого метилена ВЭВ был существенно (примерно на 70%) выше, чем ВЭВ при использовании этилацетата. Наиболее продуктивной по ВЭВ оказалась двухнедельная культура гриба на среде СС: выход экстрактов (хлористый метилен) составил около 180 мг/л, этилацетатных – около 85 мг/л (табл. 3).

**Биологическая активность экстрактов. Фитотоксическая активность.** Состав твердого питательного субстрата оказал существенное влияние ( $p < 0.01$ ) на фитотоксическую активность экстрактов из культур *S. cirsi* S-47 в отношении пырея и осота: вне зависимости от сроков культивирования и экстрагента экстракты из культур гриба на пшене были в 1.5–2 раза токсичнее, чем экстракты из культур на перловой крупе. Различия в фитотоксичности экстрактов из культур *S. cirsi* S-47, полученных на пшениной и рисовой крупах, были несущественными на уровне  $p = 0.05$ . Листья осота были наиболее чувствительными к гексановым экстрактам из двухнедельных культур *S. cirsi* S-47 на пшене, листья пырея – к хлористометиленовым экстрактам из трехнедельных культур гриба.

Важно отметить, что гексановые экстракты из культуры гриба на пшене вне зависимости от сроков культивирования, а также этилацетатный экстракт из двухнедельной культуры на пшене имели относительно высокую (диаметр некроза на листовых высечках 3.5–4 мм) и селективную

Таблица 1. Продуктивность и биологическая активность экстрактов из твердофазных культур *S. cirsi* S-47

Субстрат	Время, нед	Экстрагент <sup>1</sup>	Выход экстрактивных веществ, мг/кг <sup>2</sup>	Фитотоксическая активность		Антимикробная активность <sup>5</sup>		Цитотоксическая активность <sup>6</sup>		Антиэстеразная активность <sup>7</sup>	ТСХ <sup>8</sup>
				осот <sup>3</sup>	пырей <sup>4</sup>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	A549	U251		
Пшениная крупа	2	Гексан	280	3.7	0	0	5	59	45	14	13
		Хлористый метилен	619	1.5	0	1	6	70	82	13	14
	3	Этилацетат	475	3.5	1.3	1	6	82	92	21	15
		Гексан	891	3.8	0.9	0	0	80	79	25	16
	2	Хлористый метилен	294	2.8	2.1	0	4	74	93	25	17
		Этилацетат	93	1.1	0	0	4	91	95	23	18
Рисовая крупа	2	Гексан	381	2.7	0.8	0	0	93	78	17	1
		Хлористый метилен	622	1.8	0	0	5	78	95	21	2
	3	Этилацетат	181	2.8	0	0	4	92	93	28	3
		Гексан	362	1.8	1	0	1	36	10	21	4
	2	Хлористый метилен	410	2.6	0	0	2	85	82	19	5
		Этилацетат	199	1.6	1	0	3	92	89	28	6
Перловая крупа	2	Гексан	521	3	0.8	0	3	89	82	16	7
		Хлористый метилен	665	1	0	0	6	93	102	32	8
	3	Этилацетат	315	1.8	0	0	6	90	107	27	9
		Гексан	281	1.4	0	0	0	98	92	24	10
	2	Хлористый метилен	263	1.5	0.9	0	0	96	82	21	11
		Этилацетат	335	1.7	0	0	0	92	102	23	12

Примечание. <sup>1</sup> – последовательная экстракция тремя растворителями; <sup>2</sup> – мг/кг сухого субстрата, НСР<sub>0,05</sub> = 190; <sup>3</sup> – диаметр некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 1.4; <sup>4</sup> – длина некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 0.8; <sup>5</sup> – зона лизиса, мм; <sup>6</sup> – концентрация белка в лунках с клетками, % к контролю; <sup>7</sup> – ингибирование карбоксилэстеразы, % к контролю; <sup>8</sup> – дорожка на ТСХ-хроматограмме (рис. 1).



фитотоксическую активность в отношении осота (табл. 1). Несколько меньшую фитотоксичность (диаметр некроза 2.5–3 мм) для листьев осота проявили двухнедельные гексановые экстракты из культуры на рисе и перловой крупе, хлористометиленовые экстракты из трехнедельных культур, полученных на пшенице и рисе, этилацетатный экстракт из 2-недельной культуры на рисе. Остальные экстракты были фитотоксичны на уровне контроля или достоверно не отличались от него (табл. 1).

Отмечено достоверное влияние ( $p < 0.01$ ) состава жидкой питательной среды на фитотоксичность экстрактов из культурального фильтра *S. cirsi* S-47 в отношении обоих тестируемых растений. Время культивирования гриба не оказывало существенного влияния на токсичность экстрактов в отношении осота (при  $p = 0.05$ ), тогда как различия в чувствительности пырея к экстрактам жидких культур гриба, полученных в разное время культивирования, были достоверными (на уровне  $p < 0.01$ ) вне зависимости от экстрагента. Хлористометиленовые экстракты были достоверно более токсичными для осота, чем этилацетатные (на уровне  $p < 0.05$ ).

Максимальную неселективную фитотоксическую активность (диаметр некрозов около 7 мм на высечках из листьев осота, длина некрозов на отрезках листьев пырея — около 5 мм) проявил экстракт (полученный хлористым метиленом) из трехнедельного культурального фильтра гриба, выращенного на среде ЧАВ. Фитотоксичность аналогичного экстракта из двухнедельных культур была примерно в 3 раза ниже (табл. 3).

Фитотоксическая активность комплексов экзометаболитов, образующихся при культивировании гриба на среде ДМГ, была в целом ниже, чем при выращивании на среде ЧАВ. Относительно высокую неселективную фитотоксичность (диаметр/длина некрозов более 3 мм) показали хлористометиленовые экстракты из двухнедельной и трехнедельной культур *S. cirsi* S-47. Экстракты, полученные с помощью этилацетата, были менее фитотоксичны, чем хлористометиленовые (табл. 3).

Относительно невысокую, но специфичную в отношении осота фитотоксическую активность (диаметр некроза 2–3.5 мм) выявили у экстрактов, полученных из фильтра культур *S. cirsi* на среде СС. У экстрактов из двухнедельного культурального фильтра гриба она была выше, чем у экстрактов из трехнедельного фильтра. При этом, этилацетатные экстракты были более фитотоксичными, чем хлористометиленовые (табл. 3).

**Антимикробная активность экстрактов.** *Escherichia coli* и *Candida tropicalis* оказались нечувствительными к экстрактам *S. cirsi* S-47, выращенного на твердых средах. Заметная антибиотическая активность экстрактов гриба проявлялась только в отношении *Bacillus subtilis*. Вне зависи-

**Таблица 2.** Выход сухой биомассы *S. cirsi* S-47 в зависимости от состава питательной среды и сроков культивирования

Субстрат	Сроки культивирования, нед	Биомасса, г/л
ДМГ	2	1.7 <sup>а</sup>
	3	6.1 <sup>б</sup>
ЧАВ	2	5.7 <sup>б</sup>
	3	15.7 <sup>в</sup>
СС	2	25.2 <sup>г</sup>
	3	24.9 <sup>г</sup>

Примечание. Средние значения, отмеченные одной и той же буквой, не различаются при  $p = 0.05$

мости от зернового субстрата экстракты из 2-недельных культур гриба подавляли рост *B. subtilis* сильнее, чем экстракты из 3-недельных культур. Уровень активности хлористометиленовых и этилацетатных экстрактов в отношении этой бактерии был примерно одинаковым и превышал антибиотическую активность гексановых экстрактов.

Максимальную антибиотическую активность в отношении *B. subtilis* (зона лизиса 5–6 мм при концентрации экстрактов 500 мкг/диск) показали экстракты из двухнедельных культур гриба на пшеничной и перловой крупах. Несколько пониженным уровнем антибиотической активности обладали экстракты, полученные из двухнедельной культуры гриба рисовой крупы (табл. 1).

Рост тест-бактерий *E. coli* и *B. subtilis* был достоверно подавлен экзометаболитами *S. cirsi* S-47 из культурального фильтра, тогда как дрожжевой гриб *C. tropicalis* был чувствительным лишь отдельным экстрактам. При культивировании гриба на жидких средах ДМГ и ЧАВ максимальная антимикробная активность экстрактов из культурального фильтра проявлялась через 3 нед. культивирования, на более богатой по составу среде СС — через 2 нед.

Максимальную антибиотическую активность (зона лизиса колоний *B. subtilis* ~ 15 мм, *E. coli* ~ 11 мм при концентрации экстрактов 500 мкг/диск) наблюдали у экстрактов, полученных с использованием хлористого метилена, из фильтра двухнедельной культуры *S. cirsi* S-47 на среде СС и трехнедельного фильтра культуры гриба, полученной на жидкой среде ЧАВ. Примерно на 30% ниже антимикробная активность в отношении изученных двух видов бактерий была у экстрактов, полученных с хлористым метиленом, из трехнедельной культуры гриба на среде ДМГ и двухнедельной — на среде ЧАВ, а также у этилаце-

**Таблица 3.** Продуктивность и биологическая активность экстрактов из культуральных фильтратов *S. cirsi* S-47, полученных при разном времени выращивания

Субстрат	Время, нед	Экстракт <sup>1</sup>	Выход экстрактивных веществ, мг/л <sup>2</sup>	Фитотоксическая активность		Антимикробная активность <sup>5</sup>		Цитотоксическая активность <sup>6</sup>		Антиэстеразная активность		ТСХ <sup>9</sup>
				осот <sup>3</sup>	пырей <sup>4</sup>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	A549	U251	КЭ <sup>7</sup>	БХЭ <sup>8</sup>	
ДМГ	2	Хлористый метилен	82.7	4.0	2.2	6	8	77	47	12	52	19
		Этилацетат	50.0	2.0	1.4	2	6	88	98	28	94	20
	3	Хлористый метилен	56.8	3.2	3.2	6	11	78	55	20	85	21
		Этилацетат	33.1	2.6	3.1	3	9	41	18	19	74	22
ЧАВ	2	Хлористый метилен	32.4	2.3	2.0	5	10	93	49	9	47	27
		Этилацетат	17.0	3.7	2.1	8	11	н/о <sup>10</sup>	н/о	н/о	н/о	28
	3	Хлористый метилен	27.6	6.9	5.6	11	16	н/о	н/о	н/о	н/о	29
		Этилацетат	20.7	2.8	2.2	0	5	н/о	н/о	н/о	н/о	30
СС	2	Хлористый метилен	199.4	2.5	0	11	15	63	67	30	95	23
		Этилацетат	94.7	3.3	0	5	11	88	25	23	91	24
	3	Хлористый метилен	174.4	2.0	0	6	7	65	26	22	87	25
		Этилацетат	84.2	2.3	0	3	6	48	22	21	87	26

Примечание: <sup>1</sup> — последовательная экстракция двумя растворителями; <sup>2</sup> — НСР<sub>0,05</sub> = 31; <sup>3</sup> — диаметр некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 1.5; <sup>4</sup> — длина некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 1.4; <sup>5</sup> — зона лизиса, мм; <sup>6</sup> — концентрация белка в лунках с клетками, % к контролю; <sup>7</sup> — ингибирование карбоксилэстеразы, % к контролю; <sup>8</sup> — ингибирование бутирилхлоридэстеразы, % к контролю; <sup>9</sup> — дорожка на ТСХ-хроматограмме (рис. 1); <sup>10</sup> — н/о — не определяли.

татных экстрактов из двухнедельных культур на среде ЧАВ и СС (табл. 2).

**Цитотоксическая активность.** Большинство экстрактов из твердофазных культур *S. cirsi* S-47 проявляли слабую цитотоксическую активность: при концентрации экстрактов 100 мкг/мл ингибирование роста линий опухолевых клеток на уровне более 50% наблюдалось только при исследовании гексановых экстрактов из двухнедельной культуры гриба на пшенной крупе и трехнедельной — на рисовой. Причем, последний был заметно токсичнее как для клеток линии А549 (~3-кратное ингибирование роста), так и для U251 (10-кратное ингибирование пролиферации клеток по сравнению с контролем, табл. 1).

Значительное ингибирование роста обеих клеточных линий вызывали этилацетатные экстракты из трехнедельного фильтрата культур гриба на ДМГ и СС: рост клеток линии А549 подавлялся на уровне 41–48% от контроля, линии U251 — 18–22%. Клетки линии U251 были чувствительны (примерно 4-кратное ингибирование роста по сравнению с контролем) также к действию экстракта, полученного с использованием хлористого метилена, из двухнедельной культуры и этилацетатному экстракту из трехнедельной культуры гриба на СС. Примерно в 2 раза меньшую степень пролиферации клеток U251 по сравнению с контролем наблюдали при воздействии экстракта двухнедельных культур *S. cirsi* S-47 на ДМГ и ЧАВ, полученного при использовании хлористого метилена (табл. 2).

**Антиэстеразная активность.** Все изученные экстракты, показали высокую ингибирующую активность (9–32% относительно контроля) в отношении КЭ, тогда как активность БХЭ сокращение на уровне более чем 50% подавлял лишь хлористометиленовый экстракт из двухнедельной культуры *S. cirsi* S-47 на среде ЧАВ. Максимальной ингибирующей активностью (активность снижалась более чем в 10 раз по сравнению с контролем) в отношении КЭ обладал такой же экстракт двухнедельной культуры гриба на ЧАВ (табл. 3).

Экстракты из твердофазных культур *S. cirsi* S-47, а также экстракты из фильтрата жидких культур гриба на среде СС проявили в целом селективную, но относительно невысокую токсичность в отношении осота (диаметр некроза 3–4 мм), тогда как экстракты из фильтрата культур на ДМГ и ЧАВ были высоко токсичными как для листьев осота, так и пырея (табл. 1, 3). Это предположительно связано с наличием и различным содержанием в них селективного фитотоксина стагонолида Н и неселективного — стагонолида А [23, 26].

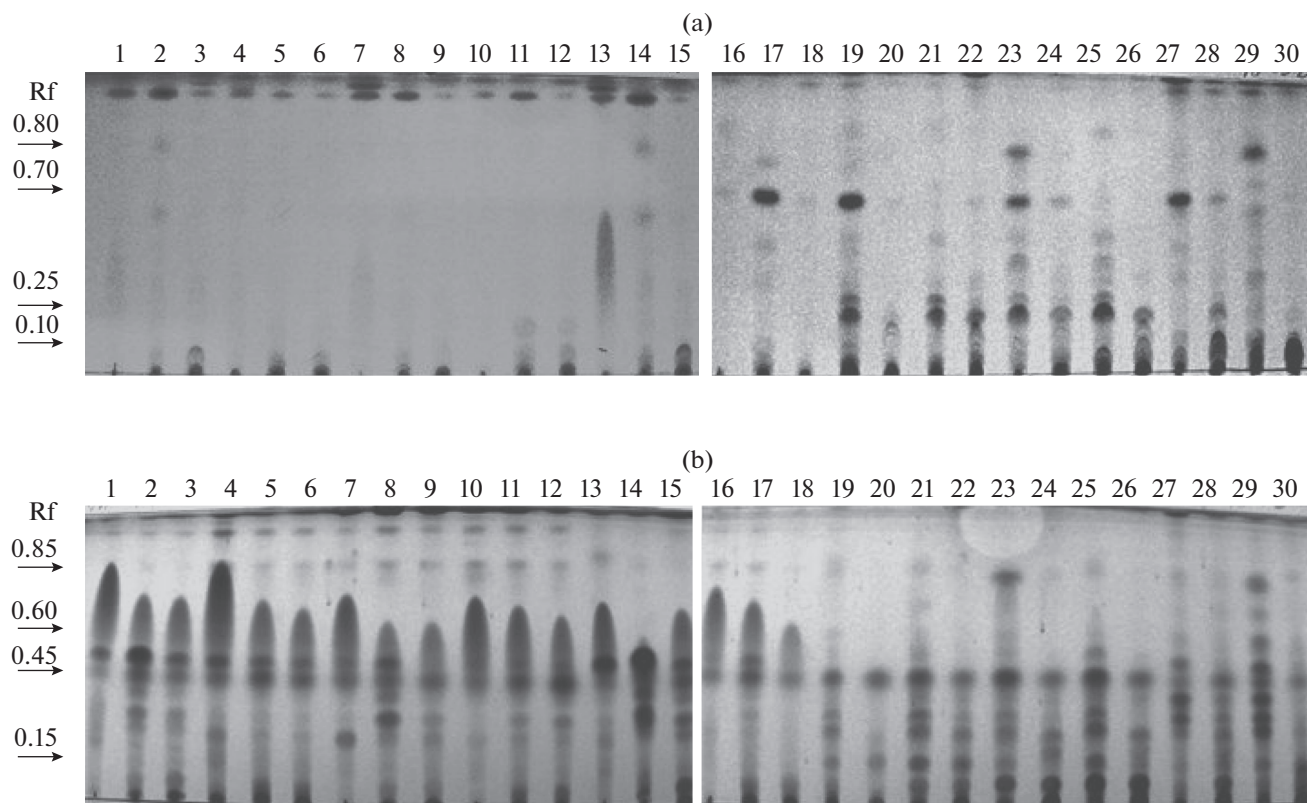
Корреляции между фитотоксической и цитотоксической или антиэстеразной активностью экстрактов не обнаружили. Цитотоксичность ноненолидов, в том числе и выявленных у *S. cirsi*,

изучена недостаточно. Как правило, они демонстрируют слабую токсичность для клеточных культур [34, 40]. Необходимо также отметить антиэстеразную активность экстрактов *S. cirsi*. Часто ее связывают с иммуносупрессивными свойствами, а также с потенциальной инсектицидной активностью. У метаболитов фитопатогенных грибов антиэстеразная активность изучена слабо. Известно лишь, что экстракты некоторых грибов из рода *Alternaria* способны ингибировать активность ацетилхолин- и бутирилхолинэстераз [41]. Ингибиторы этих ферментов могут быть использованы для лечения болезни Альцгеймера, увеличения стабильности лекарств и инсектицидов, подвергающихся быстрому расщеплению эстеразами [42–44]. Ингибирующая активность ноненолидов в отношении этих ферментов не изучена. Известно, что гербарумин I обладал сильной ингибирующей способностью в отношении кальмодулин-зависимой фосфодиэстеразы цАМФ на уровне известного ингибитора кальмодулина — хлорпромазина [45].

**Хроматографические профили экстрактов.** Проявление хроматограмм, полученных при разделении экстрактов с помощью ТСХ в системе гексан—этилацетат 1 : 1, реагентом на основе серной кислоты позволило выявить значительно больше соединений (от 3 до 11), чем при их детектировании в УФ-свете при  $\lambda$  254 нм (от 1 до 7). При этом, обнаружены заметные различия в качественном составе метаболитных комплексов, выделенных из жидких сред и зерновых субстратов (рис. 1). В экстрактах из твердофазных культур гриба преобладали алифатические соединения, не поглощающие или слабо поглощающие при  $\lambda$  254 нм. В экстрактах гриба из фильтрата культуральной жидкости обнаруживались мажорные вещества с  $R_f$  0.1, 0.25, 0.7 и 0.8 хорошо поглощающие УФ-свет

Соединение, проявляемое реагентом в виде синего пятна в диапазоне  $R_f$  от 0.5 до 0.75, наблюдали только в экстрактах из твердофазных культур гриба. Вещество с  $R_f$  0.45, окрашенное реагентом в оливковый цвет, присутствовало в экстрактах из культур, полученных как на жидких, так и на твердых субстратах, тогда как соединение с  $R_f$  0.5 — образовывалось грибом преимущественно на твердых субстратах. Полосы с  $R_f$  0.25 и 0.30, окрашенные в оливковый, коричневый, красноватый цвет, обнаружены в хлористометиленовых экстрактах из твердофазных культур сред и из фильтрата культуры на среде ЧАВ. Вещество с  $R_f$  0.15 (фиолетовая окраска реагентом) обнаружено в экстрактах из жидких культур. Более активное его образование наблюдалось при культивировании гриба на средах ДМГ и СС (рис. 1).

При проведении ВЭЖХ экстрактов из культур *S. cirsi* S-47 выявлено более 30 индивидуальных пиков, характеризующихся определенным временем



**Рис. 1.** ТСХ-хроматограммы экстрактов из жидко- и твердофазной культур гриба *S. cirsii* S-47: а – проявление реагентом на основе серной кислоты и анисового альдегида, б – проявление УФ-светом при 254 нм. Описание “дорожек” (1–30) приведено в табл. 1 и 2. Стрелки указывают обсуждаемые в тексте мажорные полосы.

удерживания и УФ-спектром. Максимальное количество мажорных метаболитов обнаружено в гексановом экстракте из двухнедельной культуры на пшене (14 пиков) и в этилацетатном экстракте из трехнедельной культуры гриба на среде ЧАВ (12 пиков). Типичные ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов, проявивших заметную биологическую активность, представлены на рис. 3 и 4.

В результате кластерного анализа состава экстрактов они разделились на 2 основных ветви, различающиеся по способу культивирования *S. cirsii* S-47. Внутри кластера А, в который вошли экстракты, полученные из культурального фильтра, необходимо отметить различия метаболитов в экстрактах, полученных с использованием этилацетата и хлористого метилена. Кластер Б составили экстракты, полученные из твердофазных культур гриба, вне зависимости от сроков культивирования и экстрагента. Субкластер Б1 можно разделить на два подкластера: Б1.І – гексановые экстракты, полученные при культивировании гриба на твердых субстратах (преимущественно на пшеничной и рисовой крупах); Б1.ІІ – преимущественно хлористометиленовые и этилацетатные экстракты, полученные при культивировании гриба на разных твердых субстратах. В субкластер Б2

вошли преимущественно хлористометиленовые экстракты из двухнедельной твердофазной культуры *S. cirsii* вне зависимости от состава субстрата (рис. 2).

В гексановом экстракте из трехнедельной культуры *S. cirsii* S-47 на пшене с широким спектром биологической активности (фитотоксической, антибактериальной и антиэстеразной) обнаружен гербарумин I ( $t_R$  3.14 мин). Интересны два неизвестных соединения ( $t_R$  4.38 мин и  $t_R$  4.55 мин) со сложными УФ-спектрами ( $\lambda_{\text{макс}}$  238, 265, 297, 389 нм и  $\lambda_{\text{макс}}$  233, 256, 300, 363 нм), которые еще не описаны у *S. cirsii* (рис. 3а). В этилацетатном экстракте также с высоким уровнем биологической активности преобладали среднеполярные и полярные соединения: в нем обнаружены стагонолид Н, гербарумин I и стагонолид А (рис. 3б).

В гексановом экстракте из трехнедельной культуры на рисе, который проявил заметную антиэстеразную активность в отношении КЭ и цитотоксическую активность в отношении обеих изученных клеточных линий, ранее идентифицированные токсичные метаболиты гриба не обнаружены. Обращает внимание присутствие неизвестных веществ с  $t_R$  4.89 мин и 4.99 мин (у

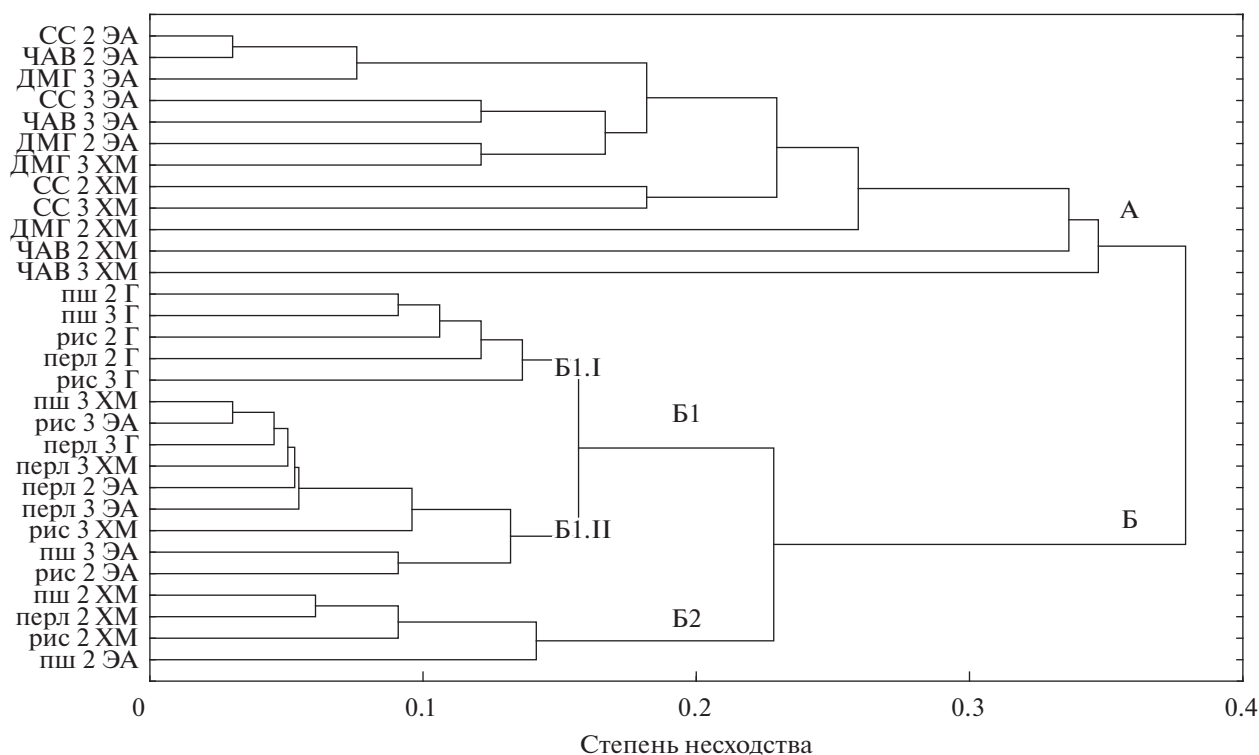


Рис. 2. Дендрограмма различий в составе экстрактов *S. cirsi* S-47 в зависимости от питательного субстрата, продолжительности культивирования и экстрагента. Г — гексан, ХМ — хлористый метилен, ЭА — этилацетат; пш — пшено, рис — рисовая крупа, перл. — перловая крупа; 2, 3 — продолжительность культивирования, нед.

обоих УФ  $\lambda_{\text{макс}}$  230 нм), а также неполярных ( $t_R > 4.5$  мин) алифатических соединений ( $\lambda_{\text{макс}} < 200$  нм) (рис. 3в).

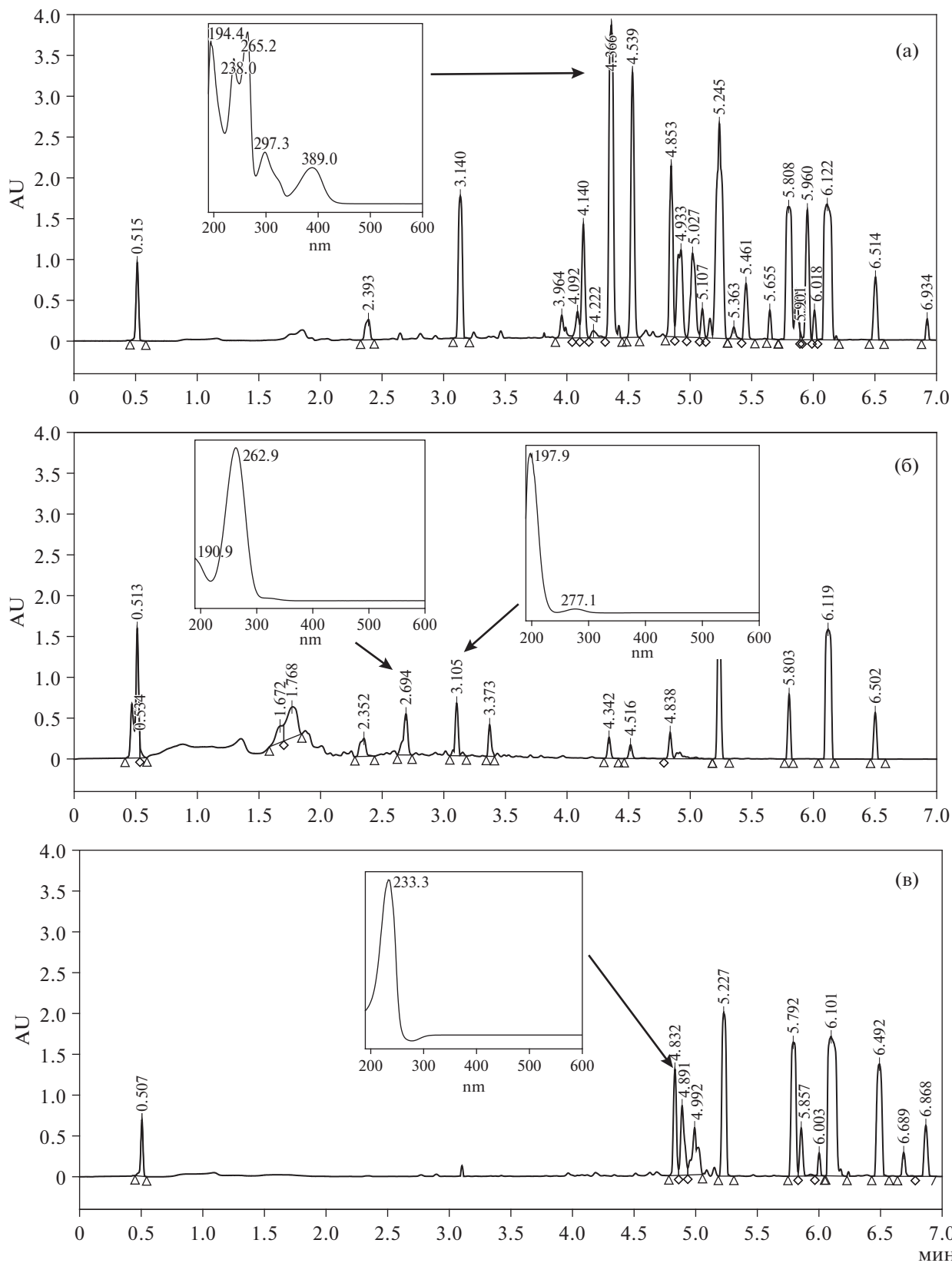
В экстракте, полученном хлористым метиленом, из фильтрата 2 недельной культуры *S. cirsi* S-47 на ДМГ, продемонстрировавшем высокую антиэстеразную активность и средний уровень антибиотической и фитотоксической активности, обнаружены следовые количества гербарумина I. Основными метаболитами экстракта были неизвестные вещества с  $t_R$  2.60 мин ( $\lambda_{\text{макс}} < 215$ , 266–287 нм) и  $t_R$  2.86 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  271 нм) (рис. 4а). В этилацетатном экстракте, проявившем высокую цитотоксическую активность, обнаружен метаболит с  $t_R$  3.1 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  252, 311 нм).

В экстракте, полученном хлористым метиленом, 3-недельной культуры *S. cirsi* S-47 на среде ЧАВ мажорными метаболитами были стагонолид Н и стагонолид А, что, очевидно, обуславливало его высокую антимикробную и фитотоксическую активность. В экстракте присутствовали также и неизвестные вещества с  $t_R$  2.38 мин ( $\lambda_{\text{макс}} < 200$ , 256 нм),  $t_R$  2.67 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  228 нм),  $t_R$  2.56 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  270 нм),  $t_R$  3.47 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  291 нм) (рис. 4б).

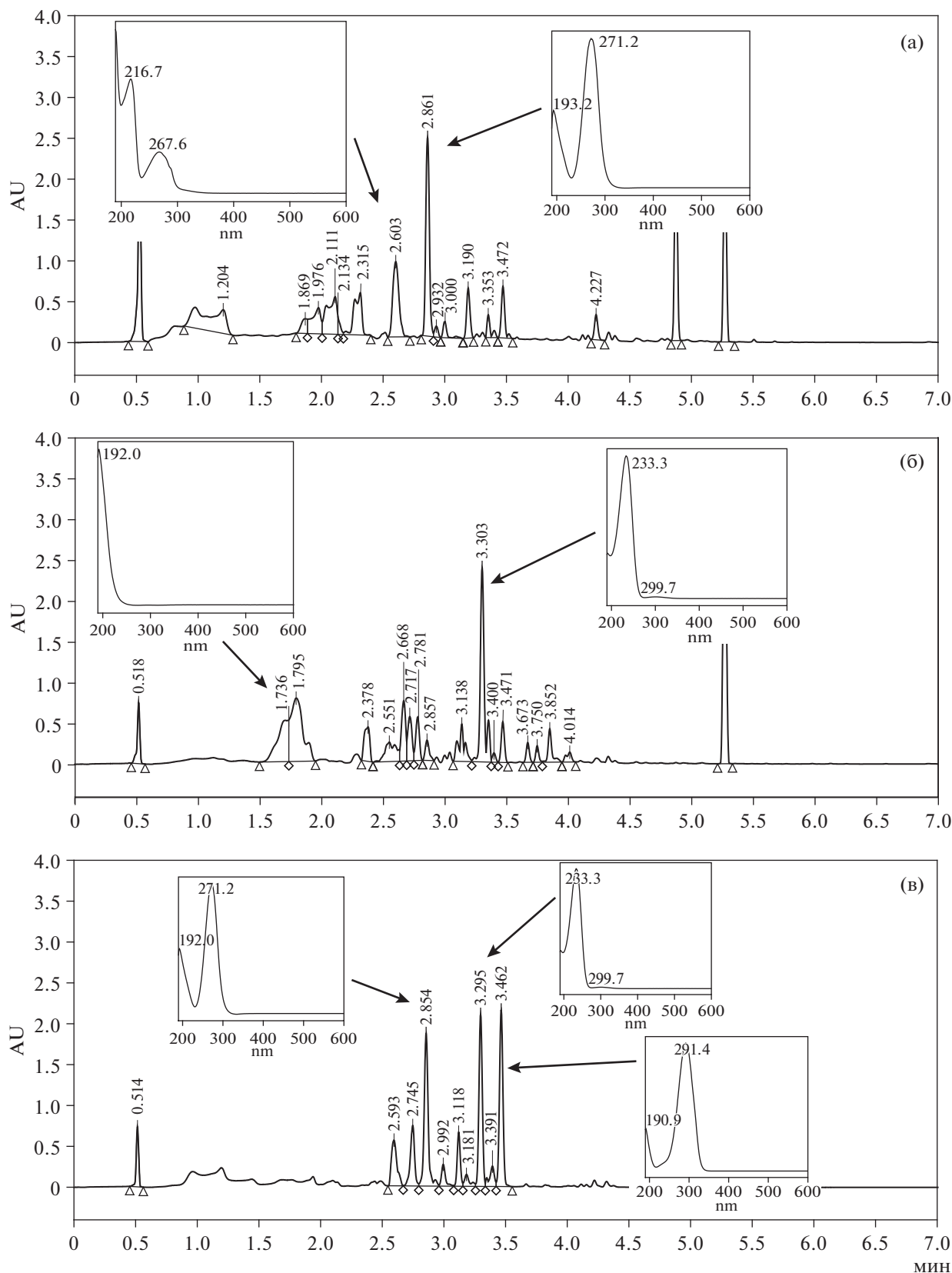
В показавшем высокую антибактериальную активность экстракте, полученном хлористым метиленом из фильтрата 2-недельной культуры

гриба на среде СС, преобладали стагонолид А и два неизвестных вещества с  $t_R$  2.86 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  271 нм) и  $t_R$  3.46 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  291 нм). (рис. 4в) Этилацетатный экстракт из этой же культуры со средним уровнем фитотоксической активности и высоким — цитотоксической и антиэстеразной, содержал стагонолид Н, гербарумин I, а также неизвестные соединения:  $t_R$  2.52 мин ( $\lambda_{\text{макс}} < 200$  нм),  $t_R$  2.86 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  271 нм),  $t_R$  3.18 мин ( $\lambda_{\text{макс}}$  252, 312 нм).

С помощью ТСХ были показаны прежде всего, существенные различия в компонентном составе экстрактов из твердо- и жидкофазных культур *S. cirsi* S-47, а также менее существенные, но хорошо детектируемые различия экстрактов из культурального фильтрата (рис. 1). Сравнительное изучение ВЭЖХ-профилей экстрактов и УФ-спектров с использованием стандартов фитотоксинов (стагонолида А, стагонолида Н и гербарумина I) показало, что выделенный из осота полевого штамм *S. cirsi* S-47, образует те же основные фитотоксические метаболиты (стагонолид А и стагонолид Н), что и штамм С-163, изолированный из листьев бодяка. Гербарумин I выявлен у этого гриба впервые. Кластерный анализ ВЭЖХ/УФ-профилей экстрактов позволил подтвердить существенные качественные различия в их компо-



**Рис. 3.** ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов, полученных из трехнедельных твердофазных культур *S. cirsi* S-47: а – гексановый экстракт из культуры, выросшей на среде с пшеном; б – этилацетатный экстракт из той же культуры; в – гексановый экстракт из культуры на рисе. Пики с  $t_R$  4.8 и 5.2 мин - из растворителя. На врезках приведены УФ-спектры характерных мажорных метаболитов.



**Рис. 4.** ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов (хлористый метилен), полученных из культурального фильтрата *S. cirsi* S-47: а – экстракт из 2-недельной культуры на ДМГ; б – экстракт из 3-недельной культуры на среде Чапека с витаминами; в – экстракт из 2-недельной культуры на среде СС. Пики с  $t_R$  4.8 и 5.2 из растворителя.

нением составе в зависимости от состава питательного субстрата и экстрагента.

Таким образом, в большинстве случаев биологическая активность экстрактов была обусловлена присутствием в них известных токсинов, однако в некоторых экстрактах, проявивших активность, их содержание было незначительным либо они отсутствовали. Следовательно, биологическая активность экстрактов может быть обусловлена и другими их компонентами. Так, практически во всех изученных экстрактах гриба выявлены соединения, ранее не описанные для *S. cirsi*. В целом следует отметить содержание в экстрактах из твердофазных культур неизученных пигментов, а в экстрактах из культурального фильтрата веществ с  $\lambda_{\text{макс}}$  при 260, 270 и 290 нм. Их дальнейшее изучение представляется важным с точки зрения более полной характеристики БАВ продуцента потенциального микогербицида на основе *S. cirsi* S-47: выявления факторов его вирулентности и для токсикологической оценки.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 16-16-00085).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берестецкий А.О. // Вестник защиты растений. 2017. Т. 91. № 1. С. 5–12.
2. Берестецкий А.О. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 501–514.
3. Ahmed N.E., Sugimoto Y., Babiker A.G.T., Mohamed O.E., Ma Y., Inanaga S., Nakajima H. // Weed Sci. 2001. V. 49. № 3. P. 354–358.
4. Abouzeid M.A., Boari A., Zonno M.C., Vurro M., Evidente A. // Weed Sci. 2004. V. 52. № 3. P. 326–332.
5. Anderson K.I., Hallett S.G. // Weed Sci. 2004. V. 52. № 4. P. 623–627.
6. Hoagland R.E., Weaver M.A., Boyette C.D. // Allelopathy J. 2007. V. 19. № 1. P. 179–192.
7. Lee H.B., Kim J.-C., Hong K.-S., Kim C.-J. // Plant Pathol. J. 2008. V. 24. № 4. P. 453–460.
8. Nzioki H.S., Oyosi F., Morris C.E., Kaya E., Pilgeram A.L., Baker C.S., Sands D. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1121.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01121>
9. Fumagalli P., Andolfi A., Avolio F., Boari A., Cimmino A., Finizio A. // Pest Manag. Sci. 2013. V. 69. № 7. P. 850–856.
10. Favilla M., Macchia L., Gallo A., Altomare C. // Food Chem. Toxicol. 2006. V. 44. № 11. P. 1922–1931.
11. Skrobek A., Boss D., Défago G., Butt T.M., Maurhofer M. // Toxicol. Lett. 2006. V. 161. № 1. P. 43–52.
12. Boss D., Maurhofer M., Schlöpfer E., Défago G. // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. № 1. P. 194–205.
13. Kouvelis V.N., Wang C., Skrobek A., Pappas K.M., Typas M.A., Butt T.M. // Mutat. Res. 2011. V. 722. № 1. P. 1–6.
14. Berestetskiy A.O., Ivanova A.N., Petrova M.O., Prokof'eva D.S., Stepanycheva E.A., Uspanov A.M., Lednev G.R. // Microbiol. 2018. V. 87. № 2. P. 200–214.
15. Deising H.B., Gase I., Kubo Y. // J. Plant Dis. Prot. 2007. V. 124.  
<https://doi.org/10.1007/s41348-017-0109-5>
16. Evidente A., Berestetskiy A., Cimmino A., Tuzi A., Superchi S., Melck D., Andolfi A. // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 23. P. 11168–11173.
17. Andolfi A., Cimmino A., Vurro M., Berestetskiy A., Troise C., Zonno M.C., Motta A., Evidente A. // Phytochem. 2012. V. 79. P. 102–108.
18. Sørensen J.L., Sondergaard T.E. // Int. J. Food Microbiol. 2014. V. 170. P. 55–60.
19. Shi W., Tan Y., Wang S., Gardiner D.M., De Saeger S., Liao Y., Wang C. Fan Y., Wang Z., Wu A. // Toxins. 2017. V. 9.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9010006>
20. Патент РФ. 2014. № 2515899.
21. Патент РФ. 2015. № 2543665.
22. Артохин К.С. Сорные растения. М.: Печатный год, 2007. 166 с.
23. Yuzikhin O., Mitina G., Berestetskiy A. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 19. P. 7707–7711.
24. Rivero-Cruz J.F., García-Aguirre G., Cerda-García-Rojas C., Mata R. // Tetrahedron. 2000. V. 56. № 30. P. 5337–5344.
25. Evidente A., Cimmino A., Berestetskiy A., Mitina G., Andolfi A., Motta A. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 31–34.
26. Evidente A., Cimmino A., Berestetskiy A., Andolfi A., Motta A. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. № 11. P. 1897–1901.
27. Greve H., Schupp P.J., Eguereva E., Kehraus S., König G.M. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. № 9. P. 1651–1653.
28. Zheng C.-J., Shao C.-L., Chen M., Niu Z.-G., Zhao D.-L., Wang C.-Y. // Chem. Biodiversity. 2015. V. 12. № 9. P. 1407–1414.
29. Tsuda M., Mugishima T., Komatsu K., Sone T., Tanaka M., Mikami Y., Kobayashi J. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. № 3. P. 412–415.
30. Trisuwan K., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Preedanon S., Sakayaroj J. // Arch. Pharm. Res. 2011. V. 34. № 5. P. 709–714.
31. Bhillabutra W., Tchowisan T., Peberdy J.F., Lumyong S. // Res. J. Microbiol. 2007. V. 2. № 10. P. 749–755.
32. Perepogu A.K., Raman D., Murty U.S.N., Rao V.J. // Bioorg. Chem. 2009. V. 37. № 1. P. 46–51.
33. Jangili P., Kashanna J., Kumar C.G., Poornachandra Y., Das B. // Bioorganic Med. Chem. Lett. 2014. V. 24. № 1. P. 325–327.
34. Sun P., Lu S., Ree T.V., Krohn K., Li L., Zhang W. // Curr. Med. Chem. 2012. V. 19. № 20. P. 3417–3455.
35. Liu Q.-A., Zheng J.-J., Gu Y.-C., Wang C.-Y., Shao C.-L. // Studies in Natural Products Chemistry. 2015. V. 44. P. 353–401.
36. Берестецкий А.О., Юзихин О.С., Каткова А.С., Добродумов А.В., Сивогризов Д.Е., Коломбет Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 84–88.



37. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. № 1. P. 88–95.
38. Yang Z.P., Dettbarn W.D. // Biochem. Pharmacol. 1998. V. 55. № 8. P. 1419–1426.
39. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
40. Sudhakar C., Reddy P.R., Kumar C.G., Sujitha P., Das B. // Eur. J. Org. Chem. 2012. V. 2012. № 6. P. 1253–1258.
41. Singh B., Bhagat J., Chadha B.S., Kaur A. // Biologia. 2014. V. 69. № 1. P. 10–14.
42. Grossberg G.T. // Curr. Ther. Res. Clin. Exp. 2003. V. 64. № 4. P. 216–235.
43. Koitka M., Höchel J., Gieschen H., Borchert H.H. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V. 51. № 3. P. 664–678.
44. Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević–Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M. // Curr. Neuropharmacol. 2013. V. 11. № 3. P. 315–335.
45. Rivero–Cruz J.F., Macías M., Cerda–García–Rojas C.M., Mata R. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. № 4. P. 511–514.

## Effects of Substrate and Duration of Cultivation on Productivity, Biological Activity, and Chromatography Profiles of Extracts Obtained from *Stagonospora cirsii* S-47

A. O. Berestetskiy<sup>a, \*</sup>, M. Yu. Belozyorova<sup>a</sup>, and D. S. Prokof'eva<sup>b</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, St.-Petersburg, 196608 Russia

<sup>b</sup>Research Institute for Hygiene, Occupational Pathology, and Human Ecology, Leningrad region, Kuz'molovskiy, 188663 Russia

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

Received February 27, 2019; revised August 01, 2019; accepted August 30, 2019

In order to determine possible toxic properties of the potential mycoherbicide based on the fungus, *Stagonospora cirsii* S-47 effects of solid and liquid media composition on yield of extractive matter (YEM), spectrum of biological activity and chromatography profiles of extracts obtained from cultures of this fungus were studied. Maximal YEM (~250 mg/L) was obtained from filtrates taken from 2-week culture of *S. cirsii* S-47 grown on sucrose-soy meal medium. The same time was optimal for production of maximal YEM (~1.5 g/kg) when the fungus was grown on pearl barley substrate. The fungal extracts showed phytotoxic, antimicrobial, cytotoxic and anti-esterase activity. Generally, extracts from culture filtrates demonstrated higher level and wider spectrum of biological activity than extracts from solid culture of *S. cirsii* S-47. Maximal phytotoxic and antimicrobial activity was found in dichloromethane extracts from the filtrate of the 3-week fungal culture on Czapek medium while the extracts from 2-week culture strongly inhibited carboxyl esterase. Maximal cytotoxic activity against cell line U251 was found in ethyl acetate extract from 3-week culture of *S. cirsii* S-47 produced on YMG liquid medium. The composition of extracts was varied considerably depending on culture substrate.

**Keywords:** *Stagonospora cirsii*, extracts, phytotoxicity, antimicrobial activity, cytotoxicity, anti-esterase activity, stagonolide, herbarumin I, mycoherbicide

УДК 577.117.3

## ОММОХРОМЫ *Hermetia illucens*: ПОЛУЧЕНИЕ, ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. А. Е. Донцов<sup>1, \*</sup>, Н. А. Ушакова<sup>2, \*\*</sup>, В. С. Садькова<sup>3, \*\*\*</sup>, А. И. Бастратов<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, Россия

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАН, Москва, 119021, Россия

\*e-mail: adontsovnick@yahoo.com

\*\*e-mail: naushakova@gmail.com

\*\*\*e-mail: sadykova\_09@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2019 г.

После доработки 24.05.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Разработана методика выделения и очистки оммохромов — пигментов сложного глаза взрослой мухи *Hermetia illucens*. Выделенные оммохромы проявляли флуоресценцию с максимумами эмиссии при 460–470 нм и 525–535 нм, интенсивность которой резко возрастала при их окислении пероксидом водорода. Методом тушения хемилюминесценции люминола определена антирадикальная активность оммохромов, величина константы составила  $(1.2 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Мелкодисперсная смесь оммохромов в 0.1 М калий-фосфатном буфере, pH 7.4, с 2.0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина проявляла антимикробную активность в отношении *B. subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 2091 и *Aspergillus niger* INA 00760. Сделано заключение, что имаго *H. illucens* — перспективный возобновляемый источник природных пигментов с высокими антиоксидантными характеристиками и антибактериальными свойствами.

**Ключевые слова:** оммохромы, *Hermetia illucens*, антимикробная активность, антиоксидантная активность, флуоресценция

**DOI:** 10.31857/S0555109920010043

Природные пигменты оммохромы широко распространены у беспозвоночных животных, в том числе, насекомых [1]. В настоящее время общепринято, что основные функции оммохромов связаны с экранированием света и антиоксидантной защитой фоторецепторных элементов ретикулярных клеток, а также с регулировкой спектральной чувствительности фоторецепторов, окраской кожных покровов и детоксикацией излишков триптофана [2–5]. Оммохромы подразделяются на два основных типа — относительно высокомолекулярные оммины и низкомолекулярные омматины [1]. Омматины, имеющие в своей структуре феноксазиновое кольцо, более характерны для глаз насекомых. В связи с возможностью масштабного разведения некоторых видов насекомых и получения возобновляемого источника биологически активных веществ, перспективных для практического использования в пищевой, фармацевтической промышленности и др., изучение оммохромов этих насекомых имеет

как фундаментальное, так и прикладное значение. Особый интерес представляет муха черная львинка *Hermetia illucens*, способная утилизировать органические отходы [6]. Ареал распространения этого дневного насекомого — тропики и субтропики [7], что вызывает необходимость защиты глаз мухи от сильного УФ-излучения и определяет функциональную значимость оммохромов.

Цель работы — определение, идентификация и разработка методов получения оммохромов из биомассы голов имаго мухи *Hermetia illucens*, изучение физико-химических свойств изолированных оммохромов и определение их антиоксидантной активности и антимикробных свойств.

### МЕТОДИКА

Объектом исследования служила муха черная львинка *Hermetia illucens*, которую выращивали в лабораторных контролируемых условиях ИПЭЭ РАН с использованием зерна пшеницы в качестве

кормового субстрата для личинок. Имаго (взрослых мух) содержали при искусственном освещении. В качестве источника света применяли люминесцентные светильники 4 × 18 Вт (“Лайтлюкс”, Россия). Интенсивность освещения составляла не менее 5000 лк, световой режим — 12 ч. Из собранных обездвиженных замораживанием насекомых вручную отделяли головы, которые хранили в замороженном виде при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Масса головы черной львинки не превышала  $2.4 \pm 0.03$  мг, что составляло  $8.5 \pm 0.5\%$  от тела мухи. В опыте было переработано 150 г мух (5400 особей).

Для экстракции оммохромов из голов имаго применяли 1.0% раствор HCl в метаноле [8]. Для этого 10.2 г голов мухи заливали 500 мл раствора абсолютный метанол—HCl, тщательно перемешивали и оставляли для экстракции в течение 48 ч при температуре  $6^{\circ}\text{C}$ . После этого экстракт фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат интенсивного бордового цвета нейтрализовали 20%-ным аммиаком до нейтральной величины pH. Образовавшийся рыхлый осадок отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин и вновь растворяли в 100 мл раствора метанол—HCl. Процедуру осаждения оммохромов повторяли. Полученный осадок оммохромов промывали дистиллированной водой и высушивали в эксикаторе над безводным хлористым кальцием. В результате из 10.2 г голов мухи получено 400 мг высушенного препарата. Для экспериментов использовали как истинные растворы оммохромов в кислом метаноле, так и тонкодисперсные суспензии оммохромов в 0.1 М калий фосфатном буфере, pH 7.4.

Спектры оптического поглощения измеряли на спектрофотометре “Shimadzu UV—1601PC” (Япония). Спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре “Shimadzu RF-5301PC” (Япония). Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение RFPC версия 2.0 (“Shimadzu”).

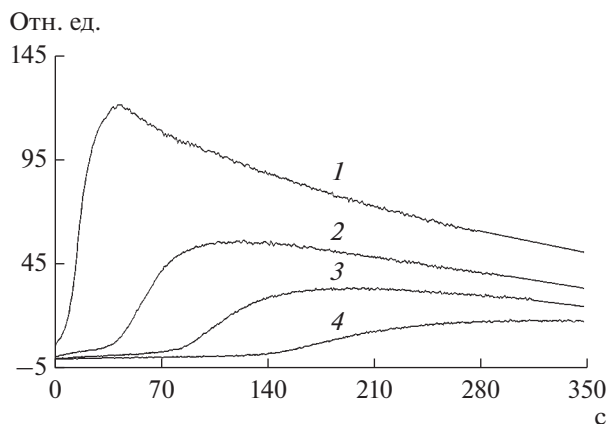
Антирадикальную активность полученных оммохромов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола, как описано в работе [9]. В качестве измеряемых параметров был взят латентный период достижения максимальной интенсивности свечения. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре “Shimadzu” RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. Для количественной оценки способности оммохромов взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе данной модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации пигмента и

сравнивали с такой же зависимостью для аскорбата, для которого известна константа тушения хемилюминесценции в данных условиях. Константу тушения хемилюминесценции люминола оммохромами оценивали, принимая молекулярную массу последних равной 440 Да. Среда для инкубации содержала 0.05 М К-фосфатный буфер, pH 7.4, 2.0 мкМ гемоглобина, 100 мкМ люминола, 100 мкМ ЭДТА, и различные концентрации оммохромов в 0.1 М К-фосфатном буфере, pH 7.4 или в растворе метанол—HCl. Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор без оммохромов.

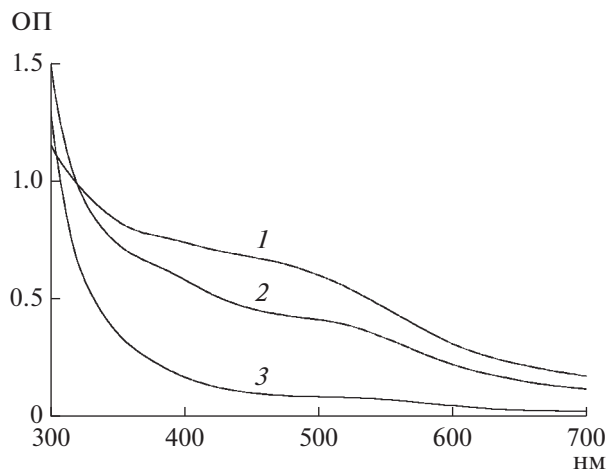
Для определения антимикробной активности оммохромов получали мелкодисперсную смесь в 0.1 М калий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 2.0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Конечная концентрация оммохромов составила 1.0 мг/мл. Спектр антимикотической активности оммохромов определяли на тест-культурах условно-патогенных грибов и бактерий из коллекции культур Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Москва, Россия). Условно-патогенные грибы принадлежали к роду *Aspergillus*: *A. fumigatus* 5K, *A. niger* INA 00760; дрожжевые условно-патогенные грибы: *Candida albicans* ATCC 2091, *C. tropicalis* INA 00763. Спектр антибактериального действия определяли с использованием тест-культур штаммов грамположительных — *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429 и грамотрицательных бактерий — *E. coli* ATCC 25922. Антимикробную активность определяли диско-диффузионным способом при двукратном разведении исходного раствора в диапазоне концентраций от 0.25 до 1.0 мг/диск с использованием стерильных бумажных дисков (“НИИ Пастера”, Россия), смоченных в соответствующих растворах и высушенных в стерильных условиях. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В для грибов (80 мкг/мл, “НИИ Пастера”, Россия) и оксациллином для бактерий (“НИИ Пастера”, 10 мкг/мл).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности жизнедеятельности тропической мухи *H. illucens*, связанные с обитанием имаго в условиях высокой освещенности с повышенной долей ультрафиолетовых лучей в спектре [10], вызывают необходимость соответствующей защиты глаз. Известно, что у насекомых защитные функции выполняют пигменты оммохромы, присутствующие в омматидиях сложного глаза в высоких концентрациях. Например, содержание ксантоматина в глазу у мухи *Calliphora erythrocephala* составляет 15–20% сухого веса глаза [11]. В настоящем исследовании показано, что у взрослых мух



**Рис. 1.** Кинетика хемилюминесценции люминола в присутствии различных концентраций (7–60 мкг/мл) экстракта оммохромов черной львинки *H. illucens*. 1–7, 2–20, 3–30, 4–60 мкг/мл по сухому веществу экстракта оммохромов.

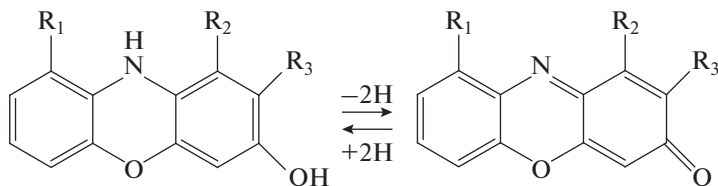


**Рис. 2.** Спектр поглощения очищенных оммохромов *H. illucens* в калий-фосфатном буфере (рН 7.4). 1 – исходный спектр, 2 и 3 – в присутствии 1%-ного раствора пероксида водорода 20 мин и 2 ч реакции соответственно.

черной львинки *H. illucens* также присутствовали оммохромы.

Инкубация голов мухи *H. illucens* в 1.0%-ном растворе HCl в абсолютном метаноле практиче-

ски сразу привела к выходу оммохромов в раствор, о чем свидетельствовало красное окрашивание. В конце процесса экстракции интенсивно бордовый раствор содержал 2.0 мкг/мл экстрагируемых веществ. Этот экстракт проявлял высокую антирадикальную активность. На рис. 1 показана кинетика хемилюминесценции люминола, индуцированная пероксидом водорода, в присутствии различных концентраций этого экстракта (рис. 1, 1–4). Уже в небольшой концентрации (7 мкг/мл, рис. 1, 1) экстракт вызывал уменьшение интенсивности свечения, а в концентрации 60 мкг/мл значительно ингибировал процесс развития хемилюминесценции, приводя как к уменьшению амплитуды свечения, так и увеличению латентного периода (рис. 1, 4). Это свидетельствовало о высоком содержании антиоксидантов в метанольном экстракте из голов имаго мухи *H. illucens*. Можно считать, что антирадикальная активность экстракта в основном обусловлена именно содержанием оммохромов, поскольку известно, что эти вещества являются активными антиоксидантами, в то время как другой пигмент меланин, который также присутствует в мухе [12, 13], подкисленным метанолом не экстрагируется. Полученный экстракт был очищен от примесей путем двукратного переосаждения оммохромов при доведении величины рН экстракта до 7.4, что приводило к выпадению оммохромов в осадок. Супернатант, содержащий различные примеси, удаляли, а очищенные и промытые дистиллированной водой оммохромы высушивали до постоянного веса. Из 10 г сырого веса голов мухи было получено 400 мг сухого пигмента, что свидетельствует о его очень высокой концентрации в этом объекте. Очищенные оммохромы имели спектр поглощения с максимумом в видимой области при 470 нм (рис. 2, 1), что характерно для спектра поглощения омматинов и, в частности, для дигидроксантомматина – наиболее часто встречающегося пигмента сложного глаза мух. Окисление оммохромов *H. illucens* пероксидом водорода (рис. 2, 2 и 3) приводило к исчезновению максимума при 470 нм и пожелтению оммохромов. Такая реакция, по-видимому, характерна для дигидроксантомматина. Возможная схема окисления феноксазинового кольца дигидроксантомматина приведена на рис. 3. В результате окисления образуется пигмент желтого цвета, в



**Рис. 3.** Гипотетическая схема реакции окисления феноксазинового кольца оммохромов *H. illucens* пероксидом водорода.

данном случае, вероятно ксантоматин. Характер спектров поглощения указывает на возможное присутствие у мухи *H. illucens* примеси оммохромов класса омминов, что требует отдельного анализа.

Очищенные оммохромы, выделенные из голов *H. illucens*, проявляли флуоресценцию в видимых областях спектра. Нативные оммохромы характеризовались небольшой по интенсивности флуоресценцией с максимумом при 460–470 нм и более выраженной с максимумом при 525–535 нм (рис. 4а). При окислении оммохромов пероксидом водорода интенсивность флуоресценции возрастала, причем в значительно большей степени для коротковолнового максимума (рис. 4б).

Очищенные оммохромы *H. illucens* проявляли антирадикальную активность, определяемую по замедлению процесса хемилюминесценции люминола, индуцированного пероксидом водорода. На рис. 5 показана величина латентного периода развития хемилюминесценции в присутствии различных концентраций оммохромов. По этим данным проведена оценка константы тушения хемилюминесценции, которая отражает степень антирадикальной активности оммохромов. В среднем величина константы была равной  $(1.2 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , что свидетельствовало о высокой антиоксидантной эффективности экстрагированных и очищенных оммохромов.

Впервые выявлены антибактериальные свойства оммохромов в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 в концентрации 0.5 и 1.0 мг/диск (табл. 1, рис. 6). Действия на *B. coagulans* 429, *Staphylococcus aureus* FDA 209 P и грамотрицательный микроорганизм *E. coli* ATCC 25922 не было отмечено.

Также показано слабое антифунгальное действие в отношении *Candida albicans* ATCC 2091 и *A. niger* INA 00760 в концентрации 1.0 мг/диск (табл. 2).

Оммохромы – это органические пигменты красного, желто-коричневого и фиолетового цвета, практически нерастворимые в нейтральных растворителях, что определяет специфику их практического использования. Выделенные оммохромы глаз мухи черная львинка *H. illucens* обладали антиоксидантными, флуоресцентными и антимикробными свойствами. Биоантиоксиданты необходимы живым организмам для поддержания низкой интенсивности стационарного уровня свободнорадикальных автоокислительных процессов. Наличие собственной флуоресценции в видимой части спектра с максимумом 525–535 нм указывает на устойчивое существование выделенных оммохромов в восстановленной форме. Антимикробные свойства оммохромов могут служить дополнительным фактором защи-

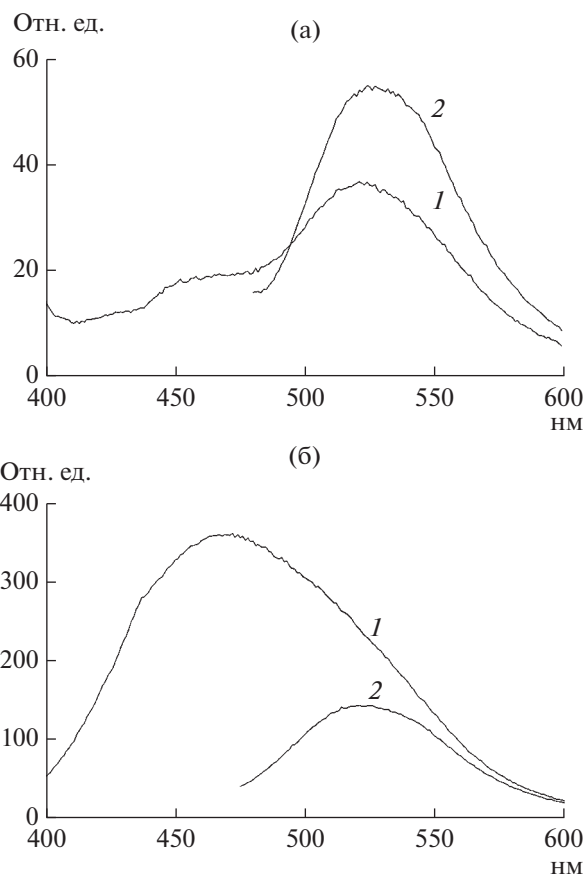


Рис. 4. Спектры флуоресценции (нм) нативных очищенных (а) и полностью окисленных 1%-ным пероксидом водорода (б) оммохромов *H. illucens* в калий-фосфатном буфере при длинах волн возбуждения 380 нм (1) и 460 нм (2).

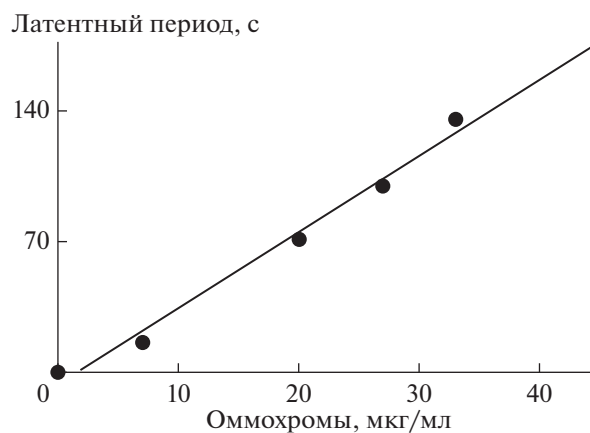
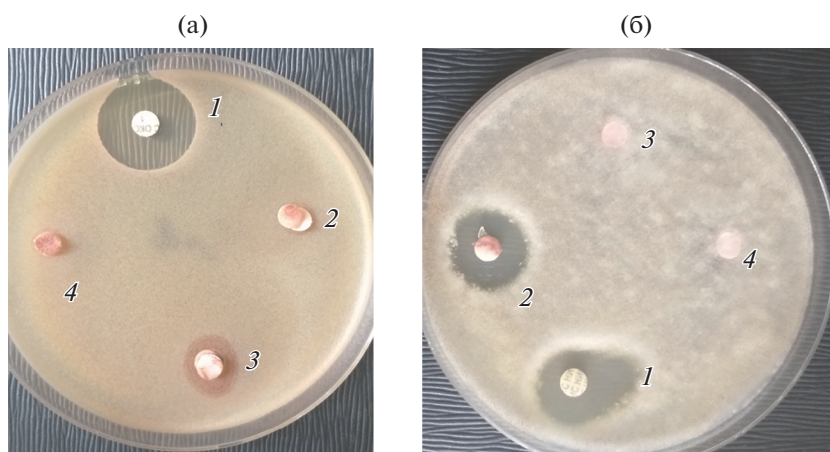


Рис. 5. Зависимость величины латентного периода (с) развития процесса хемилюминесценции люминола от концентрации оммохромов *H. illucens* (мкг/мл).



**Рис. 6.** Антимикробная активность оммохромов (2–4) в отношении условно-патогенных микроорганизмов *B. subtilis* ATCC 6633 (а) и *A. niger* INA 00760 (б): а: 1 – оксциллин; 2 – 0.25, 3 – 1.0, 4 – 0.5 мг/диск; б: 1 – амфотерицин В, 2 – 1.0, 3 – 0.5, 4 – 0.25 мг/диск.

ты глаз насекомых от болезней, вызываемых инфекцией, инвазией или травмами.

Впервые установлено, что антимикробные свойства оммохромов черной львинки могут быть связаны с наличием в их структуре феноксазинового кольца, которое входит в структуры актиномицинов например, аурантина [14]. Актиномицины действуют на грамположительные бактерии и некоторые виды грибов, являясь ингибитором синтеза РНК. Слабее выражено действие актиномицинов на грамотрицательные бактерии. Некоторые аурантины обладают также противоопухолевым действием [15]. Полученные в работе ре-

зультаты не противоречат литературным данным, но требуют дальнейшего исследования.

Антиоксиданты используются как пищевые добавки, пищевые красители, а также для введения в сырье и готовую продукцию в целях предупреждения их порчи, увеличения сроков хранения. Сочетание антиоксидантных свойств с антимикробными у оммохромов черной львинки расширяет спектр их биологической эффективности. Новая перспектива – изучение противоопухолевого действия этих веществ.

Таким образом, относительно простой способ получения пигментов позволил выделить из

**Таблица 1.** Антибактериальная активность оммохромов глаза черной львинки *H. illucens* в отношении условно-патогенных бактерий (диаметр зоны подавления роста, мм)

Тест-организм	Концентрация оммохромов, мг/диск			Оксициллин, 10 мкг/мл
	1.0	0.5	0.25	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	18 ± 0.2	9 ± 0.1	0	27 ± 0.4
<i>B. coagulans</i> 429	0	0	0	25 ± 0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P	0	0	0	23 ± 0.6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	27 ± 0.2

**Таблица 2.** Антифунгальная активность оммохромов глаза черной львинки *H. illucens* в отношении условно-патогенных грибов (диаметр зоны подавления роста, мм)

Тест-организм	Концентрация оммохромов, мг/диск			Амфотерицин В, 80 мкг/мл
	1	0.5	0.25	
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	12 ± 0.1	0	0	18 ± 0.6
<i>C. tropicalis</i> INA 00763	0	0	0	18 ± 0.6
<i>A. fumigatus</i> 5K	0	0	0	12 ± 0.6
<i>A. niger</i> INA 00760	9 ± 0.1	0	0	10 ± 0.6

промышленного разводимого насекомого – мухи *H. illucens* природные оммохромы, которые могут применяться в различных отраслях народного хозяйства.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-04-00411/19) и Минобрнауки России (ГЗ тема АААА-А18-118042490053-3).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Butenandt A., Schafer W.* Ommochromes. Recent Progress in the Chemistry of Natural and Synthetic Coloring Matters and Related Fields / Eds. Gore T.S. et al. N.-Y.: Acad. Press, 1962. P. 13–62.
2. *Донцов А.Е.* // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 1981. Т. 17. С. 53–56.
3. *Грибакин Ф.Г., Чеснокова Е.Г.* // Успехи современной биол. 1984. Т. 97. С. 69–82.
4. *Островский М.А., Зак П.П., Донцов А.Е.* // Известия РАН. Серия биологическая. 2018. № 6. С. 658–668.
5. *Островский М.А., Донцов А.Е.* // Известия РАН. Серия биологическая. 2019. № 1. С. 95–108.
6. *Kalová M., Borkovcová M.* // Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 2013. LXI. № 1. P. 77–83.
7. *Sheppard D.C., Newton G.L., Thompson S.A., Savage S.E.* // Bioresour. Technol. 1994. V. 50. P. 275–279.
8. *Ostrovsky M.A., Sakina N.L., Dontsov A.E.* // An antioxidative role of ocular screening pigments. Vision Res. 1987. V. 27. P. 893–899.
9. *Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичский О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* // Вопросы мед. химии. 1997. Т. 43. С. 87–92.
10. *Sheppard D.C., Tomberlin J.K., Joyce J.A., Kiser B.C., Sumner S.M.* // J Med. Entomol. 2002. V. 39. P. 695–698.
11. *Langer H.* Properties and Functions of Screening Pigments in Insect Eyes. In: Photoreceptor optics. Berlin-N.Y.: Springer-Verlag, 1975. P. 429–455.
12. *Ushakova N.A., Dontsov A.E., Bastrakov A.I., Garmash N.Y., Pavlov D.S.* // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2017. V. 473. № 1. P. 102–105.
13. *Ushakova N.A., Dontsov A.E., Sakina N.L., Brodsky E.S., Ratnikova I.A., Gavrilova N.N., Bastrakov A.I., Kozlova A.A., Nekrasov R.V.* // Ukrainian J. Ecology. 2017. V. 7. № 4. P. 424–431.
14. *Орлова Т.И., Силаев А.Б.* // Антибиотики. 1967. Т. 12. № 4. С. 283–287.
15. *Ашмарин И.П.* Молекулярная биология, избранные разделы. М.: Медицина, 1974. 360 с.

### Ommochromes from *Hermetia illucens*: Isolation, Research of Antioxidant Characteristics and Antimicrobial Activity

A. E. Dontsov<sup>a,\*</sup>, N. A. Ushakova<sup>b,\*\*</sup>, V. S. Sadykova<sup>c,\*\*\*</sup>, and A. I. Bastrakov<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup>*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, 119334, Russia*

<sup>b</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, 119071, Russia*

<sup>c</sup>*Gause Institute of New Antibiotics, RAS, Moscow, 119021, Russia*

\**e-mail: adontsovnick@yahoo.com*

\*\**e-mail: naushakova@gmail.com*

\*\*\**e-mail: sadykova\_09@mail.ru*

Received February 19, 2019; revised May 24, 2019; accepted August 30, 2019

A technique has been developed for the isolation and purification of ommochromes – pigments of the complex eye of the adult fly *Hermetia illucens*. The isolated ommochromes showed fluorescence with emission maxima at 460–470 nm and 525–535 nm, the intensity of which sharply increased upon their oxidation with hydrogen peroxide. The method of quenching the chemiluminescence of luminol was used to determine the antiradical activity of ommochromes; the constant value was  $(1.2 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . A finely dispersed mixture of ommochromes in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, with 2.0 mg/ml bovine serum albumin showed antimicrobial activity against *B. subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 2091 and *Aspergillus niger* INA 00760. It was concluded that the imago *H. illucens* is a promising renewable source of natural pigments with high antioxidant characteristics and antibacterial properties.

**Keywords:** ommochromes, *Hermetia illucens*, antimicrobial activity, antioxidant activity, fluorescence

УДК 579.6

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ С КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ АНТИГЕНАМИ КЛЕТОК *Herbaspirillum seropedicae* Z78 ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИМ ДАТЧИКОМ

© 2020 г. О. И. Гулий<sup>1,2,\*</sup>, Н. С. Величко<sup>1</sup>, Ю. П. Федоненко<sup>1</sup>, В. Д. Бунин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049 Россия

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

<sup>3</sup>EloSystem GbR, Берлин, 13407, Германия

\*e-mail: gulyi\_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Электрооптическим методом с применением фаговых антител к основным антигенам клеток *Herbaspirillum seropedicae* Z78 (ЭПС1, КПС1 и ЛПС) проведена оценка их комплементарного взаимодействия в системе антиген–антитело. Показано, что электрооптический анализатор позволяет разграничивать присутствие/отсутствие специфического взаимодействия фаговых антител с основными эпитопами бактериальной поверхности. Выявленные закономерности изменения электрофизических параметров хорошо согласовывались с компонентным составом антигенов *Herbaspirillum*, их топографическим распределением, а также были подтверждены результатами электронной микроскопии и дот-анализа. Продемонстрирована возможность применения метода электрооптического анализа для детекции *Herbaspirillum* spp. с экспонированными на их поверхности антигенами. Полученные результаты могут служить основой при создании теста для быстрого определения данных микроорганизмов.

**Ключевые слова:** фаговые антитела, липополисахарид, экстраклеточный липополисахарид, электрооптический датчик, детекция

**DOI:** 10.31857/S0555109920010079

В результате снижения иммунорезистентности населения планеты все чаще возникают инфекции, вызываемые условно-патогенными бактериями. Основными оппортунистическими агентами становятся представители почвенной микрофлоры. Грамотрицательные  $\beta$ -*Proteobacteria*, включающие *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Herbaspirillum* и другие почвенные микроорганизмы, широко представлены в биосфере и играют важную роль в различных областях народного хозяйства [1–3]. *Herbaspirillum* spp. широко населяет биосферу как в свободноживущем состоянии [1, 4], так и в тканях экономически и агрономически значимых сельскохозяйственных культур [5–7]. Увеличивается количество работ, отмечающих способность *Herbaspirillum* провоцировать и утяжелять течение септических процессов [8–13]. Первоначальная ошибочная идентификация гербаспирилл как представителей *Burkholderia* spp. была связана с их близким филогенетическим и фенотипическим сходством с *Burkholderia cepacia* [11, 13]. Диагностика гербаспирилл осложняется отсутствием для них коммерчески доступных тест-систем. В связи с этим улучше-

ние методов детекции *Herbaspirillum* для создания экспресс-метода оценки бимолекулярной реакции антиген–антитело и их обнаружения представляет интерес с практической точки зрения.

Эффективным инструментом для решения проблем биотехнологии и прикладной микробиологии оказываются методы, основанные на анализе электрофизических параметров клеток в переменном электрическом поле [14–17]. Регистрация оптическим способом изменений электрических характеристик суспендированных клеток носит название электрооптического (ЭО) анализа. Ранее была показана возможность применения метода ЭО анализа для идентификации микробных клеток при их взаимодействии с поликлональными и моноклональными антителами [15, 18, 19]. При развитии ЭО метода дифференциальной диагностики микробных клеток важен подбор соответствующих антител (Аг).

Основными антигенами (Аг) поверхности бактерий являются экзо- и эндотоксины гликополимерной природы. Капсула бактерий содержит капсульные полисахариды (КПС), а микробная



слизь – внеклеточные или экстраклеточные полисахариды (ЭПС). К гликополимерам, преобладающим на поверхности у грамотрицательных бактерий, наряду с КПС и ЭПС, относят липополисахариды (ЛПС), формирующие наружный слой внешней мембраны. Капсульные гликаны ряда бактерий представляют собой экстраклеточную форму ЛПС [20, 21], а некоторые бактерии при определенных условиях способны выделять ЛПС в окружающую среду [22]. Все они играют важную роль в иммунохимическом поведении микроорганизмов [23–27].

Традиционно для серологических и иммунохимических исследований используют поликлональные или моноклональные Ат, получение которых включает этап иммунизации животных, который может быть затруднителен при низкой иммуногенности или высокой токсичности Аг. Известно, что для эффективной диагностики достаточно одной антигенсвязывающей области (Fab- или Fv-фрагмента), то есть присутствие Fc-фрагмента Ат необязательно [28]. В качестве альтернативы классической иммунизации можно осуществлять эффективный отбор Ат в формате фагового дисплея [29, 30]. Селекция Аг-связывающих фрагментов Ат (сFv, Fab), представленных на поверхности нитевидного фага, проводится, как и селекция В-лимфоцитов, по способности взаимодействовать с Аг. Подобно плазматическим клеткам, нарабатывающим Ат, бактериальные клетки, инфицированные фагами, в геноме которых содержатся соответствующие гены, способны секретировать растворимые фрагменты Ат, успешно применяемые для идентификации микроорганизмов [14, 31, 32].

Получение фаговых антител (м-Ат<sub>ЭПС</sub>, м-Ат<sub>КПС</sub> и м-Ат<sub>ЛПС</sub>) на основные антигены бактерий рода *Herbaspirillum* (ЭПС, КПС и ЛПС) и их дальнейшее применение для быстрого скрининга бактерий методом электрооптического анализа представляет значительный интерес.

Цель работы – получение м-Ат<sub>ЭПС</sub>, м-Ат<sub>КПС</sub> и м-Ат<sub>ЛПС</sub> к основным антигенам *Herbaspirillum seropedicae* Z78 (ЭПС, КПС и ЛПС) и оценка возможности их применения для детекции *Herbaspirillum* spp. методом электрооптического анализа.

## МЕТОДИКА

**Микробные клетки и условия их культивирования.** В работе использовали культуры *Herbaspirillum seropedicae* Z78 (IBPPM217), *Azospirillum brasilense* Sp245 (IBPPM 219) и *Escherichia coli* XL-1 (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>).

*H. seropedicae* Z78 выращивали в жидкой синтетической питательной среде с витаминами [33]

в течение 24 ч при 30°C, что соответствовало окончанию экспоненциальной фазы роста бактерий. *A. brasilense* Sp245 и *E. coli* XL-1 выращивали на жидкой среде LB в течение 18–20 ч при 30°C, как описано [34].

**Выделение и очистка ЛПС.** Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 40 мин), осадок трижды ресуспендировали в 0.15 М NaCl, механически перемешивали и переосаждали. Экстракцию ЛПС из высушенной ацетоном бактериальной массы проводили горячим 45%-ным водным фенолом по модифицированной методике [35]. ЛПС очищали двукратным ультрацентрифугированием (105000 g, 4 ч). Препараты ЛПС лиофилизировали с использованием Benchtop 2K (“Virtis”, США).

**Выделение внеклеточных гликополимеров.** Гликополимеры выделяли как описано в работе [33]. Все фракции, содержащие углеводы, которые не поглощали между 240 и 260 нм, объединяли, концентрировали и лиофилизировали. В результате были получены и охарактеризованы экстраклеточный (ЭПС) и капсульный (КПС) гликополимеры [33].

**Получение фаговых антител.** Фаговые антитела к ЛПС, ЭПС и КПС получали с использованием овечьей фаговой библиотеки, любезно предоставленной профессором Харрисом (W.J. Harris, Griffin, 1, Великобритания; 10<sup>12</sup> вирионов/мл) [36]. В качестве твердой фазы для закрепления Аг использовали полистирольный 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа (ИФА). В лунку вносили 200 мкл 1.0 мг/мл соответствующего Аг и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. ЛПС, ЭПС и КПС связывались с подложкой за счет электростатического взаимодействия. Неспецифичное связывание исключали блокированием в течение 1 ч пространства на стенках планшета, не занятого Аг, 2%-ным раствором БСА в фосфатно-солевом буфере. Затем в лунку вносили 200 мкл фаговой библиотеки в солевом буфере с твином (TBS-T) и после инкубации в течение 12 ч при 4°C планшет трехкратно отмывали этим буфером. Связавшиеся фаговые частицы элюировали 0.1 М глицин-HCl-буфером, pH 2.5, и использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма XL-1 Blue.

Аликвоты объемом 200 мкл с плотностью клеток *E. coli* штамм XL 1 Blue не менее 10<sup>12</sup> кл./мл высевали на чашки Петри с TYE агаром, в который добавляли антибиотики: тетрациклин, ампициллин и канамицин для предотвращения заражения *E. coli* хелперными и библиотечными фагами. Клетки культивировали в течение 18 ч при 37°C. Рост *E. coli* отмечался только на среде с тетрациклином. Отбирали единичную колонию *E. coli* и высевали на питательную среду 2TY, после чего культивировали в течение ночи на термошейкере

для достижения экспоненциальной фазы роста бактерий при 37°C. После этого культуру (из расчета 1 часть культуры на 5 частей среды) высевали на свежую питательную среду 2ТУ и культивировали в течение 4 ч при 37°C. Культуру помещали в термостат на 30 мин при 37°C без перемешивания для образования F-пилей. Далее *E. coli* заражали фаговой библиотекой и культивировали в течение 30 мин при 37°C. Затем высевали (из расчета 1 часть культуры на 5 частей среды) на свежую питательную среду 2ТУ, содержащую 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампицилина, и культивировали в течение ночи при 37°C, после чего термостатировали 30 мин при 37°C. В бактериальную культуру, полученную на предыдущем этапе, вносили 200 мкл 10<sup>11</sup> вирионов/мл фага M13K07 и инкубировали в течение 1.5 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием (1000 g, 10 мин), осадок ресуспендировали в 2ТУ среде, содержащей 100 мкг/мл ампицилина, 25 мкг/мл канамицина и 1.25 мкл/мл изопропил-β-D-тиогалактозида. Это позволило размножиться клеткам, содержащим как специфичный, так и вспомогательный (хелперный) фаг.

После инкубации клетки центрифугировали (1000 g, 10 мин), а к супернатанту, содержащему фаги, добавляли 1/5 объема ПЭГ/NaCl и инкубировали 1 ч при 4°C. Затем суспензию фаговых антител центрифугировали при 17000 g 20 мин и 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 3 мл 0.01 М фосфатно-солевого буфера (PBS). Фаговую суспензию диализовали в течение 24 ч против 0.01 М PBS. Полученные фаговые частицы использовали для последующих раундов селекции, осуществляемых в аналогичных условиях, но с уменьшением вдвое концентрации антигенов, как описано в работе [37] для увеличения специфичности фаговых антител. Было проведено 4 раунда селекции бактериофагов, при этом с каждым раундом вдвое уменьшалась концентрация Ag для увеличения специфичности At. Начальная концентрация Ag составляла 1 мг/мл.

Для количественной характеристики полученных At использовали соотношение  $(A_{269} - A_{320}) \times 5 \times 10^{14} / 15$ , где  $A_{320}$  – оптическая плотность суспензии при 320 нм и  $A_{269}$  – при 269 нм. Концентрацию фаговых частиц определяли из расчета  $A_{269} - A_{320} = 30$  оптических единиц, что соответствовало  $2 \times 10^{14}$  вирионам/мл [38]. Концентрация фаговых антител составила  $1.2 \times 10^{13}$ ,  $2.2 \times 10^{13}$  и  $2.6 \times 10^{13}$  вирионов/мл для ЛПС, КПС и ЭПС соответственно.

Титр сыворотки определяли с помощью ИФА по общепринятой методике [39]. Измерение проводили на Specord BS-250 UV (“Analytic Jena”, Германия) при 490 нм. Титр полученных фаговых мини-At составил 1 : 4000.

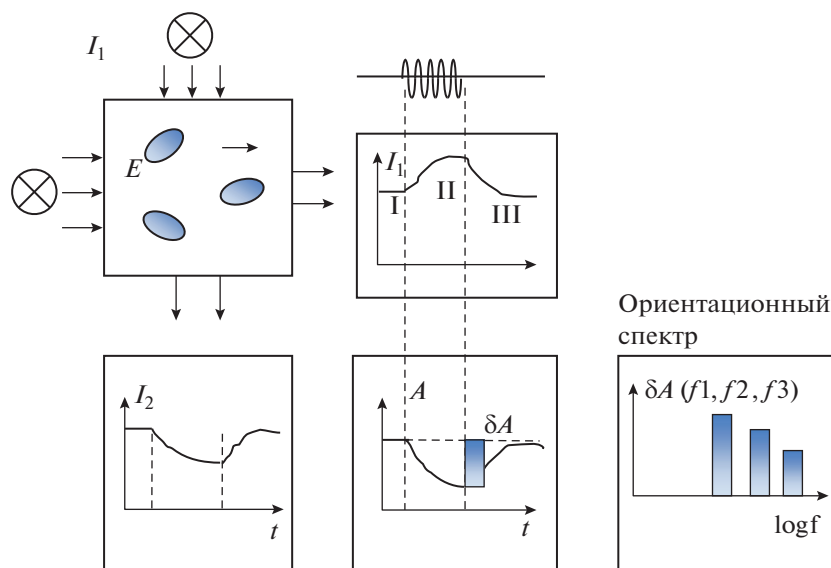
**Дот-иммуноанализ.** Для дот-анализа использовали мембрану Western S (“Sigma-Aldrich”, США) и культуру клеток *H. seropedicae* Z78 с концентрацией  $1.06 \times 10^{11}$  кл./мл (по эталону мутности), как описано ранее [14].

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).** Подготовку препаратов для электронно-микроскопических снимков осуществляли при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (“CarlZeiss”, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ, как описано в работе [34], в Центре коллективного пользования научным оборудованием, применяемым в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

**Проведение электрооптического анализа клеточных суспензий.** Перед проведением ЭО осуществляли трехкратную отмывку клеток всех используемых штаммов от культуральной среды центрифугированием (2800 g, 5 мин). Для этого использовали дистиллированную воду с электропроводностью 1.6–1.8 μS/см. Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HI 8733 (“HANNA”, США). Полученную суспензию центрифугировали (1000 g, 1 мин) для устранения конгломератов. Оптическую плотность при  $A_{670}$  полученного супернатанта доводили дистиллированной водой до значения ~0.42–0.45, что соответствовало  $4.5 \times 10^8$  и  $1.6 \times 10^9$  кл./мл для *A. brasilense* Sp245 и *H. seropedicae* Z78 соответственно. Ориентационные спектры клеток измеряли на электрооптическом анализаторе ELOAnalyser (“EloSystemGbR”, Германия). Параметры измерения: напряженность электрического поля ( $E$ ) 93.1 В/см, длина волны света 670 нм (относительно вакуума), время ( $t$ ) приложения электрического поля 3.0 с. Объем измерительной ячейки составлял 1 мл. В экспериментах оперировали дискретным набором частот ( $f$ ) ориентирующего электрического поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

Логарифмическая зависимость разности значений оптической плотности суспензии ( $\Delta A$ ), измеренной при распространении пучка неполяризованного света ( $I$ ) вдоль и поперек направления электрического ориентирующего поля, была получена при последовательном изменении частоты радиоимпульсов. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток [16].

Для оценки взаимодействия антигенных детерминант микробных клеток с фаговыми антителами в измерительную ячейку к 1 мл суспензии *H. seropedicae* Z78 ( $1.6 \times 10^9$  кл./мл) вносили 3 мкл м-At ( $1.2 \times 10^{13}$ ,  $2.2 \times 10^{13}$  и  $2.6 \times 10^{13}$  вирионов/мл для ЛПС, КПС и ЭПС соответственно) и измеряли ЭО сигнал. При проведении исследований с клетками *A. brasilense* Sp245 условия экспериментов были аналогичными с *H. seropedicae* Z78, од-



**Рис. 1.** Схема измерения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО-анализа в моменты приложения электрического поля (I, хаотическая ориентация клеток), его выключения (II, клетки в ориентированном состоянии) и возвращения клеток в состояние с хаотической ориентацией (III).

нако количество клеток *A. brasilense* Sp245 в измерительной ячейке составляло  $4.5 \times 10^8$  кл./мл.

Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти измерений. Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010. Доверительные интервалы определены для надежности 95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

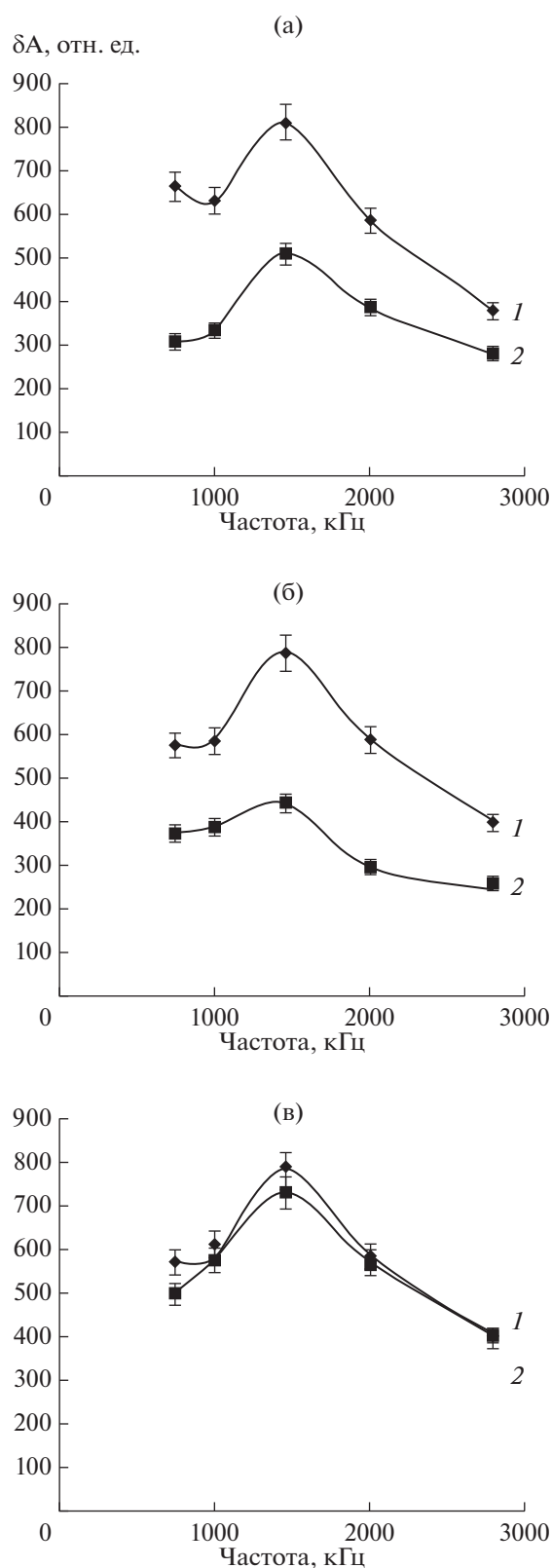
Клеточная оболочка бактерий представляет собой сложную структуру с экспонированными на поверхности углеводными остатками, защищающую и в то же время осуществляющую взаимодействие клетки с окружающей внешней средой. Многие микроорганизмы образуют капсулы вокруг своих клеточных стенок и выделяют специфическую слизь, в которой происходят межклеточные взаимодействия. Бактериальные капсулы содержат КПС, тогда как микробная слизь состоит из ЭПС. Структурное разнообразие позволяет ЭПС и КПС функционировать в клеточных взаимодействиях в качестве сигнальных молекул [23, 40, 41]. Наряду с КПС и ЭПС, к основным поверхностным антигенам относятся ЛПС. Они участвуют в процессах адгезии, механизмах узнавания чужеродных объектов и индукции защитных реакций макропартнера. Однако данные, касающиеся состава экстраклеточных, капсульных и мембранных гликополимеров *Herbaspirillum*, фрагментарны [42, 43].

Для изучения различной экспонированности углеводных антигенных детерминант бактериальной поверхности с помощью метода ЭО анализа

использовали штамм *H. seropedicae* Z78. Суть метода ЭО анализа микробных суспензий заключалась в измерении вариаций их оптических свойств при воздействии на суспендированные клетки переменного электрического поля. Электрическое поле на границах смежных клеточных структур вызывало появление в нем индуцированных зарядов. Их величина зависела от электрических свойств смежных структур, и, в частности, от параметров слоя поверхностного взаимодействия [15]. Регистрируемый ЭО сигнал можно охарактеризовать двумя параметрами: его стационарной величиной после завершения ориентационных процессов  $\Delta A$  и формой релаксационной кривой (рис. 1).

Ранее было показано, что бактерии *H. seropedicae* Z78 выделяют два экстраклеточных гликополимера липополисахаридной природы. Один из них сохраняет связь с поверхностью клетки и обнаруживается в капсуле — КПС1, а второй, ЭПС1, выделяется бактериями в культуральную жидкость. При этом эти полимеры отличаются как составом моносахаридов, так составом и соотношением жирных кислот [33]. Детальная характеристика КПС1, ЭПС1 и ЛПС *H. seropedicae* Z78 представлена в работах [33, 35].

В предыдущей работе было показано, что поликлональные кроличьи Ат к очищенному препарату ЛПС не проявляли специфичности ни к одному из изученных Ат, в том числе гомологичному [44]. В связи с трудностями, возникшими при получении поликлональных кроличьих Ат, была проведена селекция фаговых антител к очищенным индивидуальным препаратам ЭПС1, КПС1 и



**Рис. 2.** Изменение величины ЭО-сигнала суспензии клеток *H. seropedicae* Z78 при взаимодействии с м-Ат<sub>LPS</sub> (а), м-Ат<sub>KPSI</sub> (б) и м-Ат<sub>EPSI</sub> (в): 1 (контроль) – суспензии клеток без добавления м-Ат; 2 – после добавления м-Ат.

ЛПС клеток *H. seropedicae* Z78 (м-Ат<sub>EPSI</sub>, м-Ат<sub>KPSI</sub> и м-Ат<sub>LPS</sub>). Их подробные характеристики приведены в работе [44].

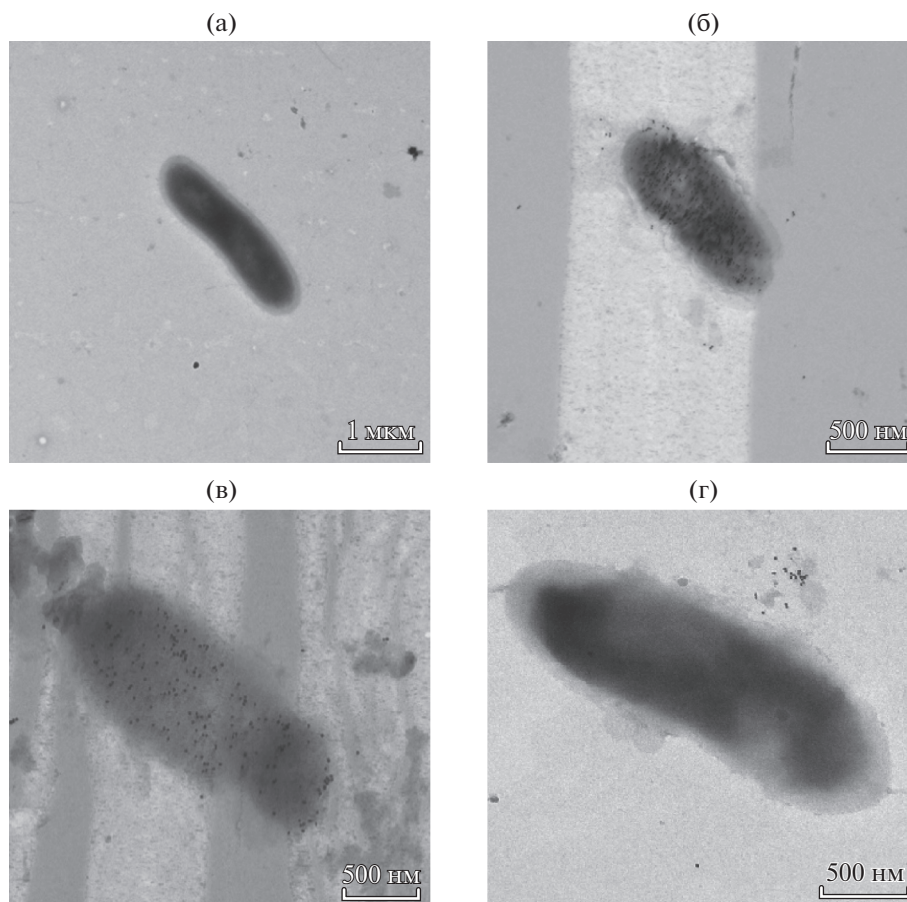
Увеличение специфичности фаговых антител оценивали с помощью ИФА. На одном уровне с гомологичным Аг взаимодействовали м-Ат<sub>LPS</sub>. Также отмечалось их взаимодействие с КПСИ. ЭПСИ отличались очень слабым (почти на уровне контроля) взаимодействием с м-Ат<sub>LPS</sub>. В то время как м-Ат<sub>EPSI</sub> взаимодействовал со всеми выделенными гликополимерами *H. seropedicae* Z78, при этом реакция с гомологичным Аг оказалась слабее, чем с КПСИ, а с ЛПС – сильнее, чем КПСИ.

Было показано, что м-Ат<sub>KPSI</sub> взаимодействовали со всеми Аг *H. seropedicae* Z78, однако максимально с ЛПС. Результаты анализа полученных данных указывали на сложную природу полисахаридсодержащих Аг поверхности *H. seropedicae* Z78. Можно предположить, что ЛПС и КПСИ обладают индивидуальными антенными детерминантами, которые узнаются м-Ат<sub>LPS</sub>, но отсутствуют в ЭПСИ.

В предыдущей работе [15] была показана общая закономерность, заключающаяся в неизменности электрооптических параметров клеточной суспензии при отсутствии специфичного взаимодействия действующего агента с бактериальными клетками. В то же время связывание агента со строго определенной антигенной детерминантой клеток приводила к выраженному изменению величины электрооптического сигнала [15]. Тем не менее не было очевидным получение аналогичных закономерностей изменения ЭО-параметров при использовании фаговых антител, специфичных к различным антигенным детерминантам (ЭПСИ, КПСИ и ЛПС) микробных клеток.

ЭО-датчиком оценивали взаимодействие антигенных детерминант клеток *H. seropedicae* Z78 с соответствующими фаговыми Ат. При анализе полученных данных решающей является разница величины ЭО-сигнала между контролем (клетки без добавления специфичных Ат) и экспериментом (клетки с добавлением Ат). Показано (рис. 2а), что при взаимодействии клеток *H. seropedicae* Z78 с м-Ат<sub>LPS</sub> величина ЭО-сигнала изменялась на 79% по сравнению с контролем (клетки без добавления Ат). Для удобства расчета полученных результатов использовали величины значений ЭО-сигнала суспензии клеток при частоте ориентирующего поля 1000 кГц.

Помимо электрооптических данных об аффинности взаимодействия клеток *H. seropedicae* Z78 с м-Ат<sub>LPS</sub> методом электронной микроскопии визуализировали образование иммунных комплексов. Результаты, приведенные на рис. 3б, подтвердили высокий уровень взаимодействия м-Ат<sub>LPS</sub> с клетками данного штамма. Дополни-



**Рис. 3.** ПЭМ клеток *H. seropedicae* Z78 ( $\times 10\,000$ ) без Ат (а) и после инкубации с м-Ат<sub>ЛПС</sub> (б), м-Ат<sub>КПС</sub> (в) и м-Ат<sub>ЭПС</sub> (г), меченными коллоидным золотом.

тельно на рис. За представлена фотография клеток *H. seropedicae* Z78 без Ат.

При изучении взаимодействия м-Ат<sub>КПС</sub> с клетками *H. seropedicae* Z78 (рис. 2б) было зафиксировано изменение величины ЭО-сигнала на 66% по сравнению с контролем (клетки без добавления Ат), то есть м-Ат<sub>КПС</sub> взаимодействовала с соответствующими Ат детерминантами клеточной поверхности. Электронно-микроскопический анализ также выявил высокую степень взаимодействия м-Ат<sub>КПС</sub> с клетками *H. seropedicae* Z78 (рис. 3в).

При оценке взаимодействия м-Ат<sub>ЭПС</sub> с клетками *H. seropedicae* Z78 при использовании значений на частотах 740 и 1000 кГц были зафиксированы изменения ЭО-параметров в диапазоне 4%, а на остальных частотах их изменений практически не наблюдали (рис. 2в). Можно предположить, что это связано со структурными различиями мембранных и экстраклеточных липополисахаридов. На рис. 3г представлены результаты электронной микроскопии, демонстрирующие отсутствие взаимодействия клеток с м-Ат<sub>ЭПС</sub>.

Полисахаридные части ЛПС и КПС состояли, помимо галактозы, глюкозы и глюкозамина, из остатков полиспиртов эритрита и глицерина. В то время как в составе ЭПС помимо указанных сахаров присутствовали только остатки глицерина. Мажорным компонентом ЭПС была глюкоза [33]. В отличие от ЛПС и КПС, расположенных вблизи и на поверхности внешней мембраны клеточной стенки, ЭПС секретируется бактериальной клеткой в окружающую среду, поэтому антигенные детерминанты, соответствующие этому полисахариду, могут полностью отсутствовать на клеточной поверхности.

На основании ранее проведенных измерений, регистрирующих взаимодействия Ат с микробными клетками, можно было ориентировочно определить критерий специфического взаимодействия как изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток на величину не менее ~5% при добавлении в суспензию клеток м-Ат. При анализе полученных данных решающей становится разница величин ЭО-сигнала между контролем (клетки без добавления специфичных м-Ат) и экспериментом (клетки с добавлением м-Ат).

**Таблица 1.** Выявление взаимодействия м-Аг с клетками методами дот-анализа и электрооптического анализа суспензий микробов

м-Аг	Микроорганизмы			
	<i>H. seropedicae</i> Z78		<i>A. brasilense</i> Sp245	
	дот-анализ	ЭО-анализ	дот-анализ	ЭО-анализ
м-Аг <sub>ЛПС</sub>	+	+	–	–
м-Аг <sub>КПС</sub>	+	+	–	–
м-Аг <sub>ЭПС</sub>	–	–	–	–

\* “+”/“–” – наличие/отсутствие четкого взаимодействия в дот-анализе, а также наличие/отсутствие разницы в сигнале между контролем и экспериментом при ЭО-анализе.

Данные, представленные на рис. 2, показали, что при взаимодействии м-Аг<sub>ЭПС</sub> с клетками *H. seropedicae* Z78 изменения ЭО-параметров зафиксировались в диапазоне 4% при использовании значений на частотах 740 и 1000 кГц, а на остальных частотах они практически отсутствовали. Для исключения ложноположительных результатов на основании ранее проведенных многократных измерений с привлечением микробных клеток других штаммов, был выработан критерий специфического взаимодействия, как изменение величины ЭО-сигнала суспензии клеток на величину не менее ~5% при внесении в суспензию специфичных антител. Указанный порог разграничивал лишь конкретные иммунохимические реакции, изученные в этой работе. Данный критерий может быть применен для тех препаратов, в которых распознаваемые бактерии присутствовали в смеси с другими бактериями или иными примесями, влияющими на  $A_{670}$  и, соответственно, определяющими их разведение. Необходимо отметить, что для определения критерия следовало принимать во внимание значение сигнала не на одной частоте, а на всем используемом наборе частот.

На следующем этапе проверялась активность м-Аг<sub>ЛПС</sub>, м-Аг<sub>КПС</sub> и м-Аг<sub>ЭПС</sub> по отношению к представителю других почвенных азотфиксирующих бактерий *A. brasilense* Sp245. Выбор этой культуры был обусловлен достаточно полным описанием ее серологических и иммунохимических свойств, что позволило корректно интерпретировать полученные результаты.

Специфичные изменения ЭО-параметров клеточных суспензий штамма Sp245 при воздействии м-Аг<sub>ЛПС</sub>, м-Аг<sub>КПС</sub> и м-Аг<sub>ЭПС</sub> не были зафиксированы. Сравнение результатов ЭО- и дот-иммуноанализа показало совпадение данных, полученных двумя независимыми методами (табл. 1).

Поскольку данные ЭО-анализа микробных суспензий были подтверждены стандартными методами дот-анализа и электронной микроскопией, можно было утверждать, что м-Аг<sub>ЛПС</sub> и м-Аг<sub>КПС</sub> взаимодействовали с клетками *H. sero-*

*pedicae* Z78, а м-Аг<sub>ЭПС</sub> нет. При этом все изученные м-Аг не взаимодействовали с клетками *A. brasilense* Sp245.

В предыдущей работе [44] было показано, что в моносахаридном составе ЛПС и КПС присутствуют рамноза, глюкозамин и галактозамин, которые могут входить и в состав АгД этих гликанов. Это объясняет взаимодействие м-Аг<sub>ЛПС</sub>, м-Аг<sub>КПС</sub> не только с гомологичными Аг, но и перекрестные реакции с ЛПС и КПС. Можно предположить, что из-за отсутствия в составе ЭПС рамнозы и присутствия глюкозамина и галактозамина лишь в следовых количествах не наблюдалось их реакции с м-Аг<sub>ЛПС</sub>, а взаимодействие м-Аг<sub>ЭПС</sub> с ЛПС и КПС объяснялось присутствием в составе указанных Аг глюкозы и галактозы. На основании всего выше изложенного можно предположить, что м-Аг<sub>ЛПС</sub> должны проявлять большую специфичность к детерминантам, содержащим рамнозу, глюкозамин и галактозамин, м-Аг<sub>ЭПС</sub> – к детерминантам, содержащим глюкозу и галактозу, а м-Аг<sub>КПС</sub> – к детерминантам, несущим в равной степени и те, и другие сахара.

В работе на примере фаговых антител (м-Аг<sub>ЭПС</sub>, м-Аг<sub>КПС</sub> и м-Аг<sub>ЛПС</sub>) к различным антигенным детерминантам клеточной поверхности *H. seropedicae* Z78 показана возможность регистрации ЭО-датчиком взаимодействия Аг с комплементарными антигенами (ЭПС, КПС и ЛПС). Установлено, что специфичные изменения ЭО-параметров клеточных суспензий при их взаимодействии с фаговыми Аг происходили только у микробных клеток, обладающих соответствующими Аг-детерминантами. Таким образом, ЭО-анализатор позволил отличать ситуации, когда бактериальные клетки взаимодействовали со специфичными фаговыми Аг, и контрольные эксперименты, когда такое взаимодействие отсутствовало. Следует отметить, что с помощью предлагаемого анализа детектировались именно микробные клетки с экспонированными на их поверхности антигенами, а не антигены.

Принципиальными преимуществами предлагаемого подхода являются его оперативность (время анализа составляло около 5 мин), отсутствие необходимости дополнительной иммобилизации компонентов и возможность многократного использования датчика.

Адаптация электрооптического метода для анализа потенциально опасных для человека микроорганизмов открывает возможность скринингового выявления идентичных антигенных детерминант в образцах, структуры которых еще не были изучены, и соотносить их с образцами полисахаридов известного строения. Результаты представляют интерес с практической точки зрения для создания экспресс-метода оценки бимолекулярной реакции Ag–Ат и могут служить основой при создании теста для быстрого обнаружения бактерий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baldani J.I., Baldani V.L.D., Seldin L., Dobereiner J. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. № 1. P. 86–93.
- Falk E.C., Johnson J.L., Baldani V.L.D., Dobereiner J., Krieg N.R. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. № 1. P. 80–85.
- Pedrosa F.O., Benelli E.M., Yates M.G., Wassem R., Monteiro R.A., Klassen G., Steffens M.B., Souza E.M., Chubatsu L.S., Rigo L.U. // *J. Biotechnol.* 2001. V. 91. № 1–2. P. 189–195.
- Ding L., Yokota A. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. № 6. P. 2223–2230.
- James E.K., Olivares F.L. // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1997. V. 17. № 1. P. 77–119.
- Boddey R.M., de Oliveira O.C., Urquiaga S., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani V.L.D., Döbereiner J. // *Plant Soil.* 1995. V. 174. № 1–2. P. 195–209.
- Rothballer M., Schmid M., Klein I., Gattinger A., Grudmann S., Hartmann A. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. № 6. P. 1341–1348.
- Baldani J.I., Pot B., Kirchoff G., Falsen E., Baldani V.L., Olivares F.L., Hoste B., Kersters K., Hartmann A., Gillis M., Döbereiner J. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996. V. 46. № 3. P. 802–810.
- Tan M., Oehler R. // *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2005. V. 13. № 5. P. 277–279.
- Coenye T., Goris J., Spilker T., Vandamme P., LiPuma J.J. // *J. Clin. Microbiol.* 2002. V. 40. № 6. P. 2062–2069.
- Spilker T., Uuer A.Z., Marty F.M., Yeh W.W., Levison J.H., Vandamme P., LiPuma J.J. // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. № 8. P. 2774–2777.
- Chen J., Su Z., Liu Y., Sandoghchian S., Zheng D., Wang S., Xu H. // *Curr. Microbiol.* 2011. V. 62. № 1. P. 331–333.
- Ziga E.D., Druley T., Burnham C.A. // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. № 11. P. 4320–4321.
- Dykman L.A., Staroverov S.A., Guliy O.I., Ignatov O.V., Fomin A.S., Vidyasheva I.V., Karavaeva O.A., Bunin V.D., Burygin G.L. // *J. Immunoassay. Immunochem.* 2012. V. 33. № 2. P. 115–127.
- Guliy O.I., Bunin V.D., Korzhenevich V.I., Ignatov O.V. // *Curr. Immun. Rev.* 2017. V. 13. № 2. P. 153–162.
- Bunin V.D., Voloshin A.G. // *J. Colloid. Interface Sci.* 1996. V. 180. № 1. P. 122–126.
- Мирошников А.В., Фомченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука, 1986. 185 с.
- Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Voloshin A.G., Dykman L.A., O'Neil D., Ivynitski D. // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 19. № 2. P. 1759–1761.
- Guliy O.I., Matora L.Yu., Burygin G.L., Dykman L.A., Ostudin N.A., Bunin V.D., Ignatov V.V., Ignatov O.V. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 370. № 2. P. 201–205.
- Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V. 118. № 2. P. 93–99.
- Смолякина О.Н., Качала В.В., Федоненко Ю.П., Бурьгин Г.Л., Здоровенко Э.Л., Матора Л.Ю., Коннова С.А., Игнатов В.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 5. С. 707–716.
- Здоровенко Г.М. // *Микробиол. журн.* 1988. Т. 50. № 4. С. 98–107.
- Оводов Ю.С. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. № 9. С. 1155–1174.
- Hols O., Ulme A.J., Brade H., Fla H-D., Rietsche E.T. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996. V. 16. № 2. P. 83–104.
- Mora L., Newton W.E. *New Horizons in Nitrogen fixation* / Ed. B. Eckert. Dordrecht: Kluwer acad. pub., 2008. 705 p.
- Saunders N.J., Pedre J.F., Hoo D.W., Moxon E.R. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27. № 6. P. 1091–1098.
- Kannenberg E.L., Carlson R.W. // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 39. № 2. P. 379–391.
- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. 589 с.
- Smith G.P., Petrenko V.A. // *Chem. Rev.* 1997. V. 97. № 2. P. 391–410.
- McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // *Nature.* 1990. V. 348. № 6301. P. 552–554.
- Nanduri V., Sorokulova I.B., Samoylov A.M., Simonian A.L., Petrenko V.A., Vodyanov V. // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 22. № 6. P. 986–992.
- Paoli G.C., Chen C.Y., Brewster J.D. // *Immunol. Methods.* 2004. V. 289. № 1–2. P. 147–155.
- Смолякина О.Н., Шишонкова (Величко) Н.С., Юрасов Н.А., Игнатов В.В. // *Микробиология.* 2012. Т. 81. № 3. С. 345–352.
- Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A., Staroverov S.A., Fomin A.S. // *Talanta.* 2018. V. 178. P. 569–576.
- Величко Н.С., Суркина А.К., Федоненко Ю.П., Здоровенко Э.Л., Коннова С.А. // *Микробиология.* 2018. Т. 87. № 5. С. 511–518.
- Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J., Harris W.J. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 9–12. P. 6221–6229.
- Griep R.A., van Twisk C., van Beckhoven J.R., van der Wolf J.M., Schots A. // *Phytopathology.* 1998. V. 88. № 8. P. 795–803.
- Smith G.P., Scott J.K. // *Meth. Enzymol.* 1993. V. 217. P. 228–257.

39. Beatty J.D., Beatty B.G. and Vlahos W.G. // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. № 1–2. P. 173–179.
40. Jiang C.H., Fan Z.H., Xie P., Guo J.H. // Front. Microbiol. 2016. V. 7:664. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00664>
41. Maruzani R., Sutton G., Nocerino P., Marvasi M. // J. Microbiol. 2019 V. 57. № 1. P. 1–8.
42. Serrato R.V., Sasaki G.L., Cruz L.M., Carlson R.W., Muszyński A., Monteiro R.A., Pedrosa F.O., Souza E.M., Iacomini M. // Can. J. Microbiol. 2010. V. 56. № 4. P. 342–347.
43. Balsanelli E., Tuleski T.R., de Baura V.A., Yates M.G., Chubatsu L.S., Pedrosa Fde O., de Souza E.M., Monteiro R.A. // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. P. e77001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077001>
44. Velichko N.S., Fedonenko Yu.P. // Ann. Microbiol. 2019. V. 69. № 7. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01490-7>

## Analysis the Interaction of the Phage Antibodies with Complete Antigens of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 Cells by an Electro-Optical Sensor

O. I. Guliy<sup>a, b, \*</sup>, N. S. Velichko<sup>a</sup>, Yu. P. Fedonenko<sup>a</sup>, and V. D. Bunin<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

<sup>b</sup>Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia

<sup>c</sup>EloSystem GbR, Berlin, 13407 Germany

\*e-mail: [guliy\\_olga@mail.ru](mailto:guliy_olga@mail.ru)

Received June 06, 2019; revised August 23, 2019; accepted August 30, 2019

By using the electro optical analysis and phage antibodies to the main antigens of *Herbaspirillum seropedicae* Z78 cells (EPSI, KPSI and LPS) for the first time were evaluated their complementary interactions in the antigen–antibody system. It was shown that the electro-optical analyzer allows one to distinguishes between the presence/absence of a specific interaction the phage antibodies with the main epitopes of the bacterial surface. The revealed patterns of the changes in the electrophysical parameters are in good agreement with the component composition of *Herbaspirillum* antigens, their topographic distribution, and are also confirmed by electron microscopy and dot-analysis. The applicability of the electro-optical analysis is demonstrated for the detection of *Herbaspirillum* spp. The results can serve as the basis for creating a test for the rapid detection these microorganisms.

**Keywords:** phage antibodies, lipopolysaccharide, extracellular lipopolysaccharide, electro-optical sensor, detection