

ISSN 0555-1099

Том 59, Номер 2

Март - Апрель 2023



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 2, 2023

Внеклеточные везикулы бактерий – медиаторы межклеточной коммуникации: практические приложения и инновационные технологии (обзор)	
<i>В. М. Чернов, А. А. Музыкантов, Н. Б. Баранова, О. А. Чернова</i>	107
Пробиотические свойства сахаромикетов (обзор)	
<i>С. А. Рябцева, А. Г. Храмцов, С. Н. Сазанова, Р. О. Будкевич, Н. М. Федорцов, А. А. Везирян</i>	120
Использование сульфатредуцирующих бактерий в биоремедиации от тяжелых металлов и металлоидов (обзор)	
<i>А. Л. Брюханов, Т. В. Хижняк</i>	133
Использование фаговых антител для определения микробных клеток (обзор)	
<i>О. И. Гулий, С. С. Евстигнеева, Л. А. Дыкман</i>	150
Получение растворимого интерферона гамма человека в системе экспрессии <i>Escherichia coli</i> при снижении температуры культивирования	
<i>Е. А. Волосникова, Т. И. Есина, Д. Н. Щербаков, Н. В. Волкова, Я. С. Гогина, Т. А. Терещенко, Е. Д. Даниленко</i>	167
Образование различных изоформ антимикробных пептидов эмерициллипсинов у <i>Emericellopsis alkalina</i> при разных условиях культивирования	
<i>А. Е. Куварина, М. А. Суконников, Е. А. Рогожин, М. В. Серебрякова, А. В. Тимофеева, М. Л. Георгиева, В. С. Садыкова</i>	174
Синергетическое взаимодействие арабиназ разного типа действия при биоконверсии свекловичного жома и яблочных выжимок	
<i>М. В. Семенова, М. С. Курышкина, А. П. Сеницын</i>	182
Обесцвечивание красителей в биоэлектрохимической системе при иммобилизации клеток <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 на поверхности анода и электрической стимуляции внешней цепи	
<i>А. А. Самков, Ю. А. Чугунова, М. Н. Круглова, Е. В. Моисеева, Н. Н. Волченко, А. А. Худокормов, С. М. Самкова, Э. В. Карасева</i>	191
Влияние бактериальных мутуалиста и фитопатогена на изменение концентраций цАМФ и H ₂ O ₂ в проростках гороха сорта рондо и его бесклубенькового и суперклубенькового мутантов	
<i>Л. А. Ломоватская, О. В. Захарова, А. М. Гончарова, А. С. Романенко</i>	200
Биопрепарат на основе иммобилизованных микроорганизмов как основа высокоэффективных органических удобрений нового поколения	
<i>Н. Ю. Юдина, Т. Н. Козлова, Т. Н. Абрамова, В. А. Арляпов, Л. Д. Асулян, В. А. Алферов, А. Н. Решетилов</i>	208

CONTENTS

Vol. 59, No. 2, 2023

Extracellular Vesicles of Bacteria Mediate of Intercellular Communication: Practical Applications and Biosafety <i>V. M. Chernov, A. A. Mouzykantov, N. B. Baranova, and O. A. Chernova</i>	107
Probiotic Properties of Saccharomycetes <i>S. A. Ryabtseva, A. G. Khramtsov, S. N. Sazanova, R. O. Budkevich, N. M. Fedortsov, and A. A. Veziryan</i>	120
Application of Sulfate-reducing Bacteria in Bioremediation from Heavy Metals and Metalloids <i>A. L. Bryukhanov and T. V. Khijniak</i>	133
The Use of Phage Antibodies for Microbial Cells Detection <i>O. I. Guliy, S. S. Evstigneeva, and L. A. Dykman</i>	150
Production of Soluble Human Gamma Interferon in the <i>Escherichia coli</i> Expression System with a Decrease in Cultivation Temperature <i>E. A. Volosnikova, T. I. Esina, D. N. Shcherbakov, N. V. Volkova, Ya. S. Gogina, T. A. Tereshchenko, and E. D. Danilenko</i>	167
Formation of Various Antimicrobial Peptide Emericellipsin Isoforms in <i>Emericellopsis alkalina</i> under Different Cultivation Conditions <i>A. E. Kuvarina, M. A. Sukonnikov, E. A. Rogozhin, M. V. Serebryakova, A. V. Timofeeva, M. L. Georgieva, and V. S. Sadykova</i>	174
Synergistic Interaction of Arabinases of Different Types of Action in the Bioconversion of Sugar Beet Pulp and Apple Pomace <i>M. V. Semenova, M. S. Kuryshkina, and A. P. Sinitsyn</i>	182
Decolorization of Dyes in the Bioelectrochemical System Depending on the Immobilization of <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 Cells on the Anode Surface and Electrical Stimulation of the External Circuit <i>A. A. Samkov, Yu. A. Chugunova, M. N. Kruglova, E. V. Moiseeva, N. N. Volchenko, A. A. Khudokormov, S. M. Samkova, and E. V. Karaseva</i>	191
Influence of Bacterial Mutualists and Phytopatogenes on Changes in Concentrations of cAMP and H ₂ O ₂ in Pea Seedles of Rondo Varieties and its Clutterless and Superclub Mutants <i>L. A. Lomovatskaya, O. V. Zakharova, A. M. Goncharova, and A. S. Romanenko</i>	200
Immobilized Microorganisms-based Biopreparation as a Major Component for New Generation High-efficiency Organic Fertilizers <i>N. Yu. Yudina, T. N. Kozlova, T. N. Abramova, V. A. Arlyapov, L. D. Asulyan, V. A. Alferov, and A. N. Reshetilov</i>	208

УДК 579.6

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ БАКТЕРИЙ – МЕДИАТОРЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ: ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ И ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2023 г. В. М. Чернов¹, А. А. Музыкантов¹, *, Н. Б. Баранова¹, О. А. Чернова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
“Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук”,
Казань, 420111 Россия

*e-mail: muzaleksei@mail.ru

Поступила в редакцию 24.09.2022 г.

После доработки 03.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Внеклеточные везикулы (ВВ), секретируемые клетками бактерий, в фокусе внимания исследователей. Они обогащены биоактивными молекулами, опосредуют межклеточную коммуникацию микро- и макроорганизмов, участвуют в адаптации бактерий к стрессовым условиям, репрограммировании клеток-мишеней, модуляции иммунореактивности у высших организмов, изменении структуры микробных сообществ и экосистем. Уникальные свойства бактериальных внеклеточных везикул (БВВ) открывают широкие перспективы их практического применения – в клинической медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии и экологии в качестве диагностических маркеров, вакцин, новых биопрепаратов и средств их доставки. Однако для реализации практических приложений необходимо решить ряд проблем. Настоящий обзор сосредоточен на проблеме неоднозначной роли БВВ в регуляции живых систем, безопасности БВВ и подходам к ее решению, связанным с инновационными технологиями.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы бактерий, медиаторы межклеточной коммуникации, малые РНК, биобезопасность, инновационные технологии, sMETASeq

DOI: 10.31857/S0555109923020046, EDN: LLCMZT

Внеклеточные мембранные везикулы продуцируются клетками микро- и макроорганизмов. Эти наноструктуры могут транспортировать разнообразные соединения и опосредовать межклеточную коммуникацию про- и эукариот [1]. Первые доказательства существования внеклеточных везикул у бактерий относятся к 60 гг. 20 в. [2–4]. Появление методов высокого разрешения позволило выявить у бактерий несколько категорий везикул, отражающих разные пути их формирования и функции [5–7]. Механизмы биогенеза бактериальных везикул, а также сортинга (селективной загрузки биомолекул в везикулы) пока мало исследованы – основной пул экспериментальных исследований приходится на определение функций БВВ и разработку способов их практического приложения. Большинство работ, посвященных БВВ, относится к поиску и анализу полезных свойств везикул и попыткам дать им практическое приложение. Акцент предлагаемого обзора сделан на неоднозначной роли БВВ в регуляции живых систем, их многоликости (независимо от того, продуцируются они патогенами или комменсалами, в том числе со статусом пробиотиков), отсутствии ис-

черпывающей информации относительно их содержания и функций и, в связи с этим, нерешенной проблеме оценки их безопасности. В обзоре обсуждаются новые возможности, которые открывают инновационные омикс-технологии (в частности, метод sMETASeq) для проведения исследований молекулярных механизмов взаимодействия БВВ с клетками эукариот и анализа токсигенности везикул, актуального для оценки их безопасности.

Функции, связанные со специфичным трафиком и межклеточной коммуникацией, обнаружены у внеклеточных везикул (ВВ) всех исследованных классических грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также бактерий, лишенных клеточной стенки (класс Mollicutes), ассоциированных с мельчайшими прокариотами. Эти везикулы представляют значительный интерес как для фундаментальных исследований, так и практических разработок как транспортеры биоактивных молекул и важные медиаторы в регуляции живых систем [8].

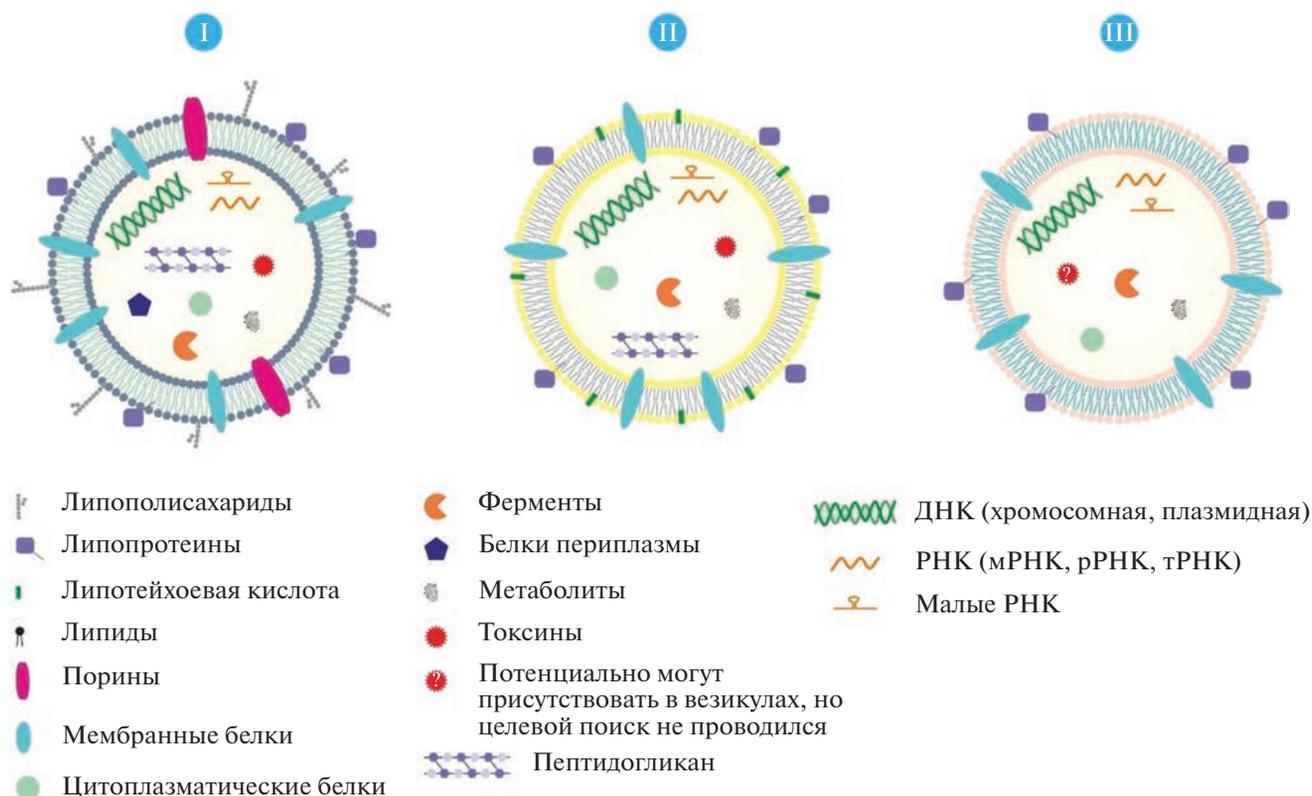


Рис. 1. Принципиальная схема структуры внеклеточных везикул бактерий: I – ВВ грамотрицательных бактерий (OM-Vs, Outer Membrane Vesicles); II – ВВ грамположительных бактерий (CMVs, Cytoplasmic Membrane Vesicles); III – ВВ молликут (EVs, Extracellular Vesicles).

ВВ, продуцируемые грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также молликутами, содержат как общие, так и различающиеся классы соединений. В БВВ обнаруживаются токсины, метаболиты, белки, липиды, ДНК, а также РНК и некоторые другие соединения. Основные различия ВВ соответствующих микроорганизмов связаны с отсутствием клеточной стенки у молликут, а также различиями их структуры у грамположительных и грамотрицательных бактерий: наличие/отсутствие соответствующих компонентов отражается на структуре продуцируемых бактериями везикул, поверхности и содержимом везикул (рис. 1). История исследования внеклеточных везикул у грамотрицательных бактерий составляет несколько десятилетий, а грамположительных – много меньше [1]. Внеклеточные везикулы у представителей класса Mollicutes – лишенных клеточной стенки бактерий, ассоциированных с мельчайшими прокариотами, способными к самостоятельному воспроизведению, были изолированы и охарактеризованы относительно недавно и лишь у немногих видов [9–11]. В отличие от L-форм бактерий, молликуты не имеют генетической основы для синтеза клеточной стенки [12], так что сравнивать эти бактерии можно в известных пределах. Однако сравнение секретируе-

мых ими везикул, представляет значительный интерес, так как у везикул L-форм бактерий могут оказаться уникальные, не описанные ранее свойства. Пока внеклеточные везикулы L-форм бактерий не исследованы, очевидно, что этот пробел в знаниях должен быть заполнен в ближайшем будущем.

Изменения условий окружающей среды, в том числе дефицит питательных веществ, окислительный стресс, ультрафиолетовое излучение, изменения температуры, pH, осмотического давления, влажности, селективное давление антимикробных препаратов, развитие вирусной инфекции и активация иммунореактивности вызывают у бактерий повышение уровня везикуляции и изменение спектра соединений в содержимом везикул [1, 13–15]. Принципиально важным является то, что в везикулах бактерий всех исследованных групп независимо от условий среды обнаруживаются малые некодирующие РНК – биомолекулы, с которыми связывают регуляторные функции БВВ [16].

Взаимодействие секретируемых транскриптов бактерий с геномом эукариот является сегодня важнейшим направлением исследований механизмов регуляции микробных сообществ и формирования системы “паразит – хозяин”. Особое

место в этом направлении занимают малые РНК, которые секретируются во внешнюю среду в составе БВВ [16]. Обогащенность малыми РНК – общее свойство БВВ [17–19].

У бактерий большинство малых РНК имеют длину от 50 до 250 нуклеотидов и, как и малые РНК эукариот (siRNA), они играют регуляторную роль в экспрессии генов на посттранскрипционном уровне [20]. Бактерии экспрессируют два типа малых РНК, которые также обнаруживаются у высших организмов, в том числе у человека: (1) РНК, которые картируются на последовательности консервативных молекул – тРНК (tRNA-derived fragments, tRFs) [21], и (2) Y RNAs [22]. Эти молекулы регулируют адаптацию бактерий к стрессорам и реализацию вирулентности [23]. В ряде работ [17, 24], в том числе в исследованиях авторов [25], на модели фибробластов кожи человека и *Acholeplasma laidlawii* (широко распространенной в природе бесстеночной бактерии, встречающейся у человека, животных, растений и являющейся основным контаминантом клеточных культур), было показано, что малые РНК, гомологичные последовательностям тРНК^{Met}, способны подавлять трансляцию у эукариот, входят в состав содержимого БВВ. Интернализация БВВ, транспортирующих такие молекулы, сопровождается изменением экспрессии генов, кодирующих белки разных функциональных групп, и модуляцией иммунореактивности эукариотических клеток-мишеней. В зависимости от вида бактерий, продуцирующих БВВ, и типа клеток-мишеней у последних регистрируется активация сигнальных систем, связанных в том числе с усилением или подавлением иммунного ответа [17, 26]. Особые свойства и высокий уровень присутствия малых РНК в везикулах бактерий вносят существенный вклад в статус БВВ как важных медиаторов в регуляции межклеточных взаимодействий и делают их основными кандидатами в диагностические маркеры для оценки физиологических состояний и патологических процессов [18].

Между тем наличие малых РНК в пуле везикул бактерии не означает, что все везикулы, продуцируемые клетками бактерии, содержат малые РНК. Внеклеточные везикулы, продуцируемые бактериальной клеткой, гетерогенны. Они различаются по размерам, содержанию, в том числе РНК, образуют субпопуляции. Такие данные были получены в работе [27], а также в исследованиях авторов [25] (рис. 2). Поскольку разные методы микроскопии обладают как достоинствами, так и недостатками, для исследования везикул рекомендуется использовать разные варианты микроскопии. Ультраструктуру везикул (в том числе наличие у них мембраны) можно исследовать с помощью трансмиссивной электронной микроскопии, но такие объекты будут “плоскими”. Сканирующая электронная микроскопия позволяет визуализи-

ровать везикулы объемно, но не позволяет увидеть ультраструктуру и т.д. Полученные авторами обзора изображения свидетельствуют о том, что везикулы *Acholeplasma laidlawii* подобны внеклеточным везикулам, продуцируемым другими бактериями. Они окружены мембраной (рис. 2а), являются сферическими структурами (рис. 2б), имеют диаметр менее 300 нм (как видно на 2а, 2б), содержат ДНК и РНК (рис. 2г, 2ж, 2и, 2к), способны проникать в клетки других бактерий и эукариот (рис. 2г, 2д, 2и, 2к). О проникновении внеклеточных везикул *A. laidlawii* в клетки *Lactiplantibacillus plantarum* свидетельствует проникновение красителей Hoechst 33342 и акридинового оранжевого, присутствовавших только внутри везикул микоплазмы. Не все везикулы, продуцируемые клетками *A. laidlawii* в конкретных условиях, содержат РНК (рис. 2е, 2ж, 2з – флуоресценция акридинового оранжевого регистрируется не во всех сферических структурах, окрашенных DiI). Различия в содержимом везикул разных субпопуляций позволяет предположить и различный функциональный потенциал соответствующих структур [28]. Однако подходы для дифференциального выделения субпопуляций везикул, в том числе содержащих/не содержащих малые РНК, пока не разработаны, что не позволяет исследовать функции разных субпопуляций везикул в межклеточной коммуникации и оценивать их с точки зрения безопасности.

Бактериальные везикулы опосредуют взаимодействия в микробных сообществах. БВВ, по-видимому, важны для жизни биосистем. Некоторые исследователи считают внеклеточные везикулы ключевыми регуляторами межклеточной коммуникации [1], в том числе в связи с практически отсутствием межвидовых барьеров между продуцентом везикул и целевыми клетками, которые бы затрудняли их опосредованное везикулами взаимодействие; а также стабильностью везикул, способностью их к длительной циркуляции; обогащенностью биоактивными молекулами, участвующими в модуляции сигнальных систем клеток, регуляции экспрессии генов и др. Кроме того, к настоящему времени не получено жизнеспособных организмов (про- и эукариот), у которых было бы полностью нарушено образование внеклеточных везикул, в отличие от мутантов по другим сигнальным и регуляторным путям. Это может указывать на особую значимость внеклеточных везикул для микроорганизмов, их взаимодействия в микробных сообществах и с клетками эукариот. Вместе с тем, межклеточные взаимодействия, как известно, координируют не только внеклеточные везикулы. Описаны и другие агенты химической коммуникации, включая гормоны, цитокины, производные жирных кислот, оксид азота и др. И, хотя наряду с классическими путями секреции, например, гормонов и цитокинов, обнаружены способы секреции этих молекул и с помощью внеклеточных ве-

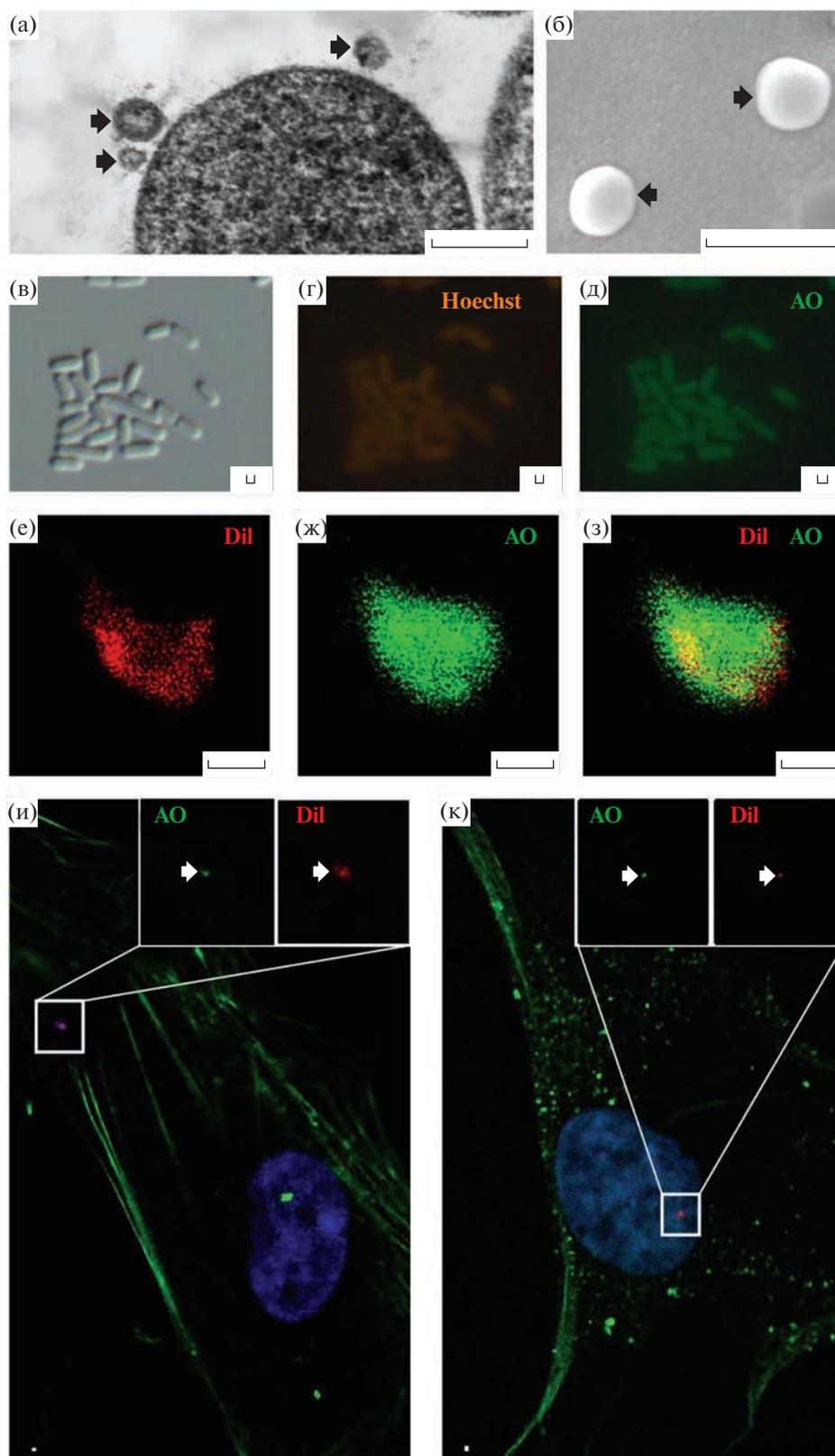


Рис. 2. Внеклеточные везикулы, продуцируемые бактериями в аксеничной (а, е–з), а также смешанной культурах (б), и взаимодействие их с клетками прокариот (в–д) и эукариот (и, к). Изображения получены с помощью ТЭМ (а), СЭМ (б), световой (в) и флуоресцентной микроскопии (г, д), конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (е–к): а – аксеничная культура *Acholeplasma laidlawii*; б – везикулы, выделенные из смешанной культуры *A. laidlawii* + *Bacillus pumilus*; в–д – клетки *Lactiplantibacillus plantarum*, инкубированные с везикулами *A. laidlawii*, окрашенными красителями Hoechst 33342 (г) и акридиновым оранжевым (д); е–з – везикулы, выделенные из аксеничной культуры *A. laidlawii*; к – фибробласты кожи человека, инкубированные с везикулами *A. laidlawii*, окрашенными красителем DiI и акридиновым оранжевым, для визуализации мембраны и РНК соответственно (ядра клеток окрашены DAPI, F-актин – с помощью антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488). Стрелками указаны везикулы бактерий. Везикулы, продуцируемые клетками *A. laidlawii*, проникают в клетки *L. plantarum* (г, д) и человека (и, к). БВВ, содержащие РНК, визуализируются в цитозоле (и) и ядре (к) фибробластов. Масштабный отрезок соответствует 500 нм. (Представленные микрофотографии получены авторами обзора).

зикул, определение “медиаторы межклеточной коммуникации” можно считать корректным отражением важных функций этих структур.

БВВ обеспечивают коммуникацию бактериальных клеток, конкуренцию и взаимопомощь, модуляцию клеточных процессов и стресс-устойчивость [29]. Опосредуемый везикулами латеральный перенос биоактивных молекул определяет возможность оперативного репрограммирования клеток-мишеней и адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды [23]. БВВ транспортируют соединения, актуальные для выживания как отдельных организмов, так и микробного сообщества в целом. В числе таких соединений – детерминанты устойчивости к антибиотикам, молекулы для формирования биопленок и чувства кворума, а также факторы вирулентности [30–32]. Присутствие этих молекул и реализация соответствующих функций обнаружены у ВВ, продуцируемых как патогенами, так и комменсалами [33, 34]. Показано, что в условиях селективного давления антимикробных препаратов БВВ, продуцируемые клетками антибиотикоустойчивых штаммов, могут осуществлять горизонтальный перенос генов и ферментов, обеспечивающих развитие резистентности к антибиотикам у чувствительных к ним бактерий. При этом в сложных ассоциатах комменсалы и патогены оказывают взаимопомощь посредством везикул. Так, БВВ *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus influenza* в условиях селективного давления ампициллина и амоксициллина способны передавать β-лактамазу *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и стрептококкам группы А, обеспечивая появление антибиотикоустойчивости у соответствующих бактерий и их выживание в микробном сообществе [35, 36]. Полученные в исследованиях авторов результаты [37], свидетельствующие об экспрессии гена β-лактамазы, а также секретиции соответствующего фермента в составе ВВ у *A. laidlawii*, индифферентной к лактамам бактерии, ассоциированной с мельчайшими прокариотами, могут указывать на фундаментальный характер феномена бактериально-го взаимодействия, опосредуемого БВВ.

В составе ВВ ряда бактерий выявлены компоненты для формирования биопленки (щелочная

протеаза, PrpL и CdrA), молекулы quorum-sensing (хинолины и лактоны), ферменты для деградации антибиотиков и факторы вирулентности (щелочная фосфатаза, фосфолипаза С, липаза и сериновая протеаза и др.), необходимые для координации и выживания микробного сообщества [38–40]. Бактериальные токсины, в том числе Antrax Toxin и холероген, тоже обнаруживаются в составе ВВ *Bacillus anthracis* и *Vibrio cholerae* соответственно [41, 42]. Подобные соединения, наряду с регуляторными РНК, могут не только обеспечивать защиту микробного сообщества от конкурентов, но в условиях селективного давления стрессоров способствовать изменению состава микробных сообществ и эволюции вирулентности микроорганизмов (появлению вирулентности у безвредных микробов окружающей среды, комменсалов, симбионтов, а также изменению степени вирулентности у патогенов) и развитию патологических процессов в биосистемах [43–45]. Для оперативной детекции подобных событий нужны эффективные диагностикумы. Перспективы создания эффективных инструментов для мониторинга структуры и функций микробных сообществ, оценки физиологических состояний и патологических процессов в биосистемах сегодня связывают с малыми РНК, в том числе в составе БВВ [46]. Особенности нуклеотидных последовательностей малых РНК, в том числе консервативных фрагментов тРНК, являющихся важной частью регуляторных РНК микроорганизмов, отражают таксономическую принадлежность их обладателей [47]. Сиквенс малых РНК исследуемых образцов позволяет определять структуру микробного сообщества, как и метагеномный анализ, основанный на сиквенсе ДНК, в том числе выделенной из ВВ сложных многокомпонентных систем (кровь, моча, содержимое кишечника, вода естественных водоемов и т.д.). Важным преимуществом метагеномного анализа, основанного на сиквенсе РНК, является то, что он позволяет идентифицировать в исследуемых образцах только живые активные микроорганизмы [48].

Бактериальные везикулы опосредуют взаимодействие клеток бактерий и хозяина. К настоящему времени опубликовано немало сообщений, свидетельствующих, что БВВ кишечной микробио-

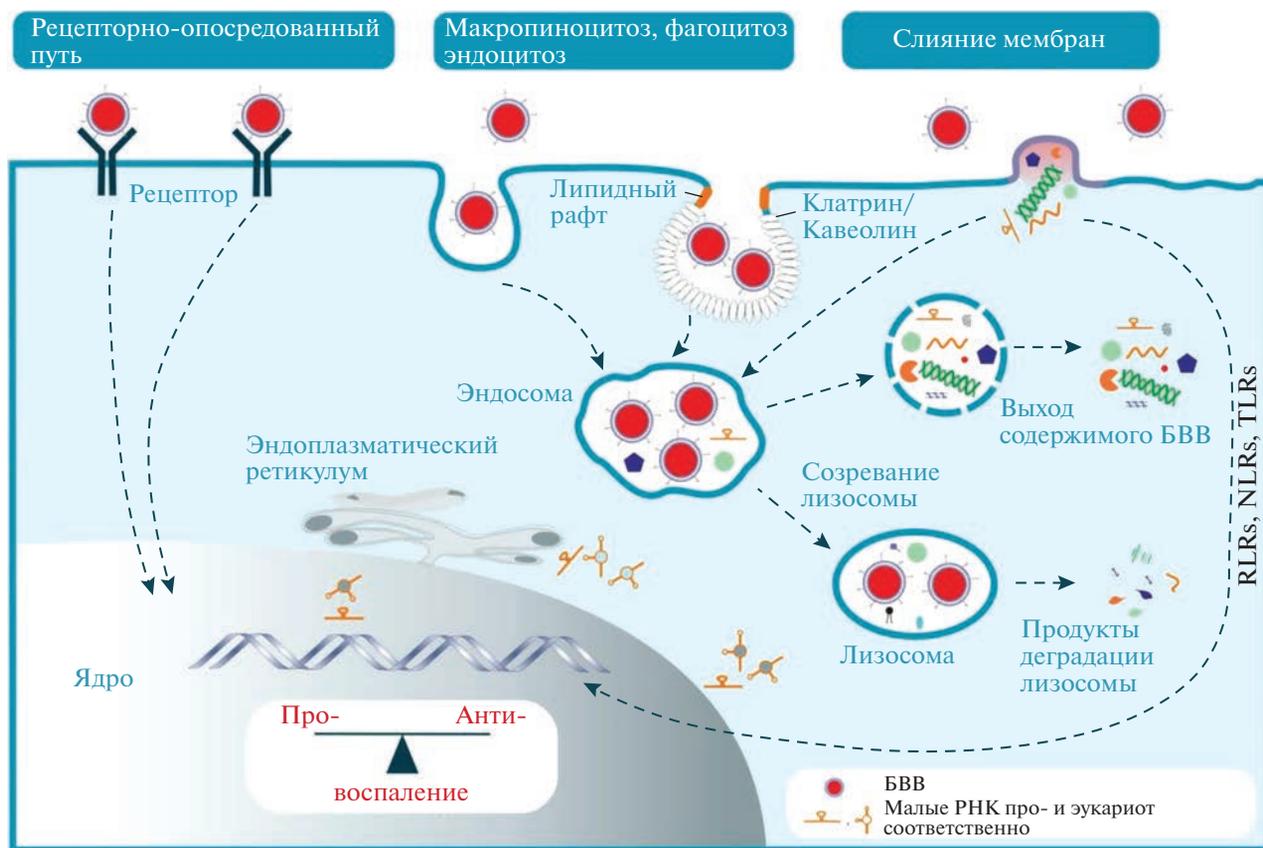


Рис. 3. Основные пути интернализации внеклеточных везикул бактерий и эффекты в отношении клеток эукариот. NLRs – NOD-подобные рецепторы, RLRs – RIG-I-подобные рецепторы, TLRs – Toll-подобные рецепторы, сенсоры врожденного иммунитета, которые узнают структуры, характерные для микробов (MAMPs), поврежденных клеток (DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns) или нуклеиновых кислот на клеточной поверхности, в эндолизосомах или цитоплазме.

ты способны преодолевать эпителиальный барьер кишечника, проникать в кровоток, лимфатическую систему и оказывать влияние на разные органы и системы высших организмов [49–51]. Это свойство БВВ может усиливаться в случае “текучести кишечника”, ассоциированной с нарушением структуры кишечной микробиоты организма. В модельных исследованиях получены данные, указывающие на способность БВВ преодолевать гематоэнцефалический барьер, инфицировать иммунocyты [52, 53], изменять экспрессию многих генов, в том числе регуляторов иммуно- и нейрореактивности, модулировать нормальные и патологические процессы у высших организмов. Однако молекулярные механизмы взаимодействия БВВ с клетками хозяина еще не вполне ясны. Считается, что основным механизмом модуляции, опосредованной БВВ, является эпигенетическая модификация, ассоциированная с действием малых РНК и метилаз, транспортируемых везикулами [54]. В этой связи внимание исследователей к роли везикул в живых системах сосредоточено на малых РНК как важных модуляторах сигнальных систем

эукариотических клеток, регуляторах экспрессии белков взаимодействующих организмов. Вместе с тем очевидно, что липиды и белки БВВ могут тоже вносить существенный вклад в процессы взаимодействия. Многофункциональность БВВ, связанная с их обогащенностью разнообразными биомолекулами, определяет возможность реализации различных сценариев взаимодействия с эукариотической клеткой и его результата. К настоящему времени описано три способа взаимодействия БВВ с клетками высших эукариот [55], из которых два связаны с непосредственной интернализацией везикул, а один с рецепторно-опосредованным путем (рис. 3).

БВВ несут набор молекул, известных как микроб-ассоциированные молекулярные паттерны (MAMPs, Microbe-Associated Molecular Patterns), которые распознаются специфическими рецепторами, экспрессируемыми эпителиальными и иммунными клетками хозяина. Эти рецепторы (TLRs, RLRs, NLRs) – базовые элементы врожденного иммунитета, определяют активацию сигнальных систем, связанных с иммунореактивно-

стью хозяина [56, 57]. Все пути взаимодействия БВВ с эукариотической клеткой запускают сигнальные системы, обуславливающие активацию про- и противовоспалительных реакций хозяина, но баланс в значительной мере определяется составом везикул наиболее представленной субпопуляции. Итог зависит от содержимого БВВ, в том числе паттерна малых РНК, способных регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. В зависимости от вида бактерии, а также способа формирования БВВ могут содержать липополисахариды с известной функцией мощного неспецифического индуктора инфламмосомы, а также варианты наборов малых РНК и белков, определяющих модуляцию иммунореактивности. При этом БВВ и патогенов и комменсалов могут вызывать однонаправленные эффекты. Активация иммунной системы, нацеленная на удаление носителей чужеродных антигенов, обуславливает также развитие воспалительных реакций, а угнетение иммунной системы, направленное на подавление воспалительных процессов, может обеспечивать персистенцию инфекционного агента. Способность индуцировать про- или противовоспалительные медиаторы в этом случае не может быть маркером негативного или позитивного потенциала и, соответственно, свидетельством вирулентности или, напротив, безопасности БВВ. Для анализа безопасности БВВ нужны биомаркеры, позволяющие оценивать как потенциал вирулентности БВВ, выраженный в профиле везикулярного вирулома, ассоциированного с факторами бактериальной вирулентности соединений, в том числе белков и малых РНК, так и его актуализацию, выраженную в ответных реакциях реципиента, в том числе профиле транскриптов. Считается, что сегодня такими маркерами могут быть малые РНК [58]. Эти молекулы, способные к интерференции с транскриптами про- и эукариотических клеток, могут изменять экспрессию соответствующих генов, и, таким образом, модулировать метаболизм клеток-мишеней [17]. В этой связи анализ профиля всего пула малых РНК ВВ и/или клеток взаимодействующих организмов в исследуемых образцах позволяет оценить как потенциал вирулентности конкретного микроба (на основе везикулярного паттерна малых РНК), так и реализацию этого потенциала на основе паттерна малых РНК реципиента, отражающего ответные реакции [47]. Применение такого алгоритма представляется актуальным как для фундаментальных исследований функций БВВ, так и практических приложений соответствующих структур.

Проблемы и перспективы практического использования БВВ. Исчерпывающих представлений о структуре, составе и функциях, а главное, безопасности БВВ пока нет ни для одного бактериального вида или штамма. Однако уникальные способности БВВ модулировать защитные и па-

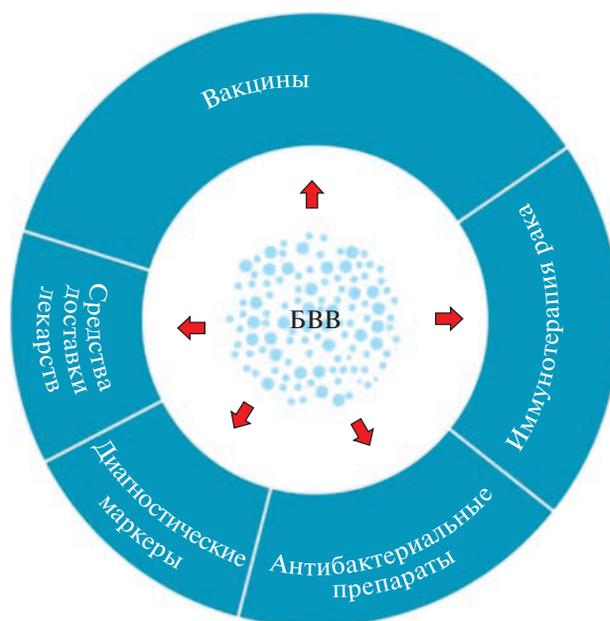


Рис. 4. Основные направления практических приложений БВВ для биомедицины. Схема построена на основе анализа опубликованных данных [8] и отражает относительное количество работ в соответствующих направлениях.

тогенные процессы у микро- и макроорганизмов уже сегодня стремятся направить в практическое русло. Активность исследований в этом направлении отражена на рис. 4, где суммированы данные по зарегистрированным на настоящий момент преclinicalным испытаниям инструментов, основанных на БВВ. Помимо этого, в последнее время обсуждаются возможности использования БВВ комменсалов, имеющих статус пробиотических бактерий, в качестве постбиотиков нового типа [59].

Способность БВВ преодолевать эпителиальные, эндотелиальные и гематоэнцефалические барьеры представляется перспективной для таргетной терапии онкологических заболеваний, ряда психических расстройств, персистентных инфекций [52]. Например, бактериальные везикулы предлагается использовать для лечения язвы, ассоциированной с *Helicobacter pylori* [60]. Природные свойства БВВ транспортировать соединения открывают перспективы использования везикул в качестве средства доставки лекарственных препаратов, а также носителей антигенов, индуцирующей активацию иммунной системы. В этой связи бактериальные наноструктуры привлекают большое внимание как принципиально новый потенциально эффективный биотехнологический инструмент для лечения онкологических заболеваний.

В результате использования нативных свойств БВВ и инжиниринга получены наноструктуры,

которые могут накапливаться в опухоли, активировать таргетный иммунный ответ и способствовать эффективному уничтожению опухоли [61–63]. Недавно были опубликованы сенсационные результаты, свидетельствующие о том, что введение модельным животным нативных ВВ, полученных от *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* и *Lactobacillus acidophilus*, приводит к стимуляции экспрессии генов-супрессоров опухолей и активации противоопухолевых иммунных реакций в опухолевых тканях [64]. Эти результаты способствовали взрыву интереса к везикулам комменсалов и интенсификации работ в этом новом направлении [65, 66]. Однако очевидно, что для внедрения БВВ в клинику потребуются преодолеть серьезные препятствия, связанные с детальным анализом везикулярного содержимого и оценкой безопасности везикул.

Значительное внимание исследователей направлено также на использование вакцинного, в том числе адьювантного, потенциала БВВ. Учитывая то, что надежная вакцина должна содержать не только целевые антигены, но и несколько патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns), БВВ могут полностью отвечать этим критериям и, по мнению ряда исследователей, стать эффективной основой для вакцин [61, 67]. Способность БВВ патогенов индуцировать эффективный иммунный ответ, обеспечивающий защиту от инфекции, был продемонстрирован в ряде исследований [68, 69]. Основанные на БВВ вакцины против *Neisseria meningitidis*, *H. pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* и *Shigella flexneri* показали свою эффективность на животных моделях [68, 69]. Однако практическое распространение пока получила только вакцина против менингита. Основанная на БВВ *N. meningitidis* (серотип В) вакцина используется сегодня в разных регионах мира, она одобрена регуляторами Кубы, Новой Зеландии, Европы и США [70, 71]. Помимо паттерна неспецифических антигенов, ВВ *N. meningitidis* несут целевые антигены и, соответственно, являются как специфичными триггерами иммунного ответа, так и адьювантами [72]. В качестве целевых антигенов используют PrgA. Поскольку структура PrgA у штаммов *N. meningitidis* варьирует, вакцина с использованием соответствующего антигена является штамм-специфичной, что ограничивает ее эффективность в случае эпидемии, вызванной другим штаммом или штаммами. Для преодоления этой проблемы на основе везикул биоинженерных штаммов *N. meningitidis* созданы вакцины, содержащие поливалентные PrgA [73].

Для усиления антигенных свойств, индуцирующих адаптивный и естественный иммунитет, а также для снижения токсигенности БВВ подвергаются модификации. Различные варианты успешного инжиниринга везикул, модулирующего их характеристики [61], широко представлены в пуб-

ликациях [8]. Большие надежды возлагают на использование наночастиц для покрытия везикул, обеспечивающих снижение негативных эффектов и усиление нужных свойств [74]. Предлагаются варианты БВВ, покрытых наночастицами золота (BM-AuNPs), наночастицами бычьего сывороточного альбумина (BN-EV), а также нагруженных наночастицами (NP-EV), являющихся более стабильными и более сильными иммуностимуляторами, чем нативные бактериальные везикулы [75, 76]. Возможность связывания бактериофагов с липополисахаридами БВВ из-за структурного родства поверхности везикул и исходных бактерий и последующей нейтрализации везикул, снижающей, соответственно их клиническую ценность, предлагается преодолевать тоже с помощью новых конструкций и модификаций везикулярной поверхности. Например, предлагается применение полиэтиленгликоля или ингибиторов системы комплемента для покрытия везикулярной поверхности, а также использование гибридных мембран для покрытия везикул [77, 78].

Предполагается, что наличие природных адгезинов на поверхности БВВ может быть полезным для антиадгезионной терапии патогенов. Вследствие конкуренции БВВ и клеток патогенов за лиганды клеток хозяина клетки патогенов в значительной мере остаются несвязанными с мишенями и, соответственно, легко распознаются иммунной системой. Практическое подтверждение этому уже есть. Возможность успешной блокады адгезии *H. pylori* к эпителиальным клеткам желудка с помощью ВВ *H. pylori* была продемонстрирована в работе [79]. Между тем, адгезины БВВ могут запускать опасный каскад сигнальных путей у высших организмов [80], приводящих к серьезным патологиям в долгосрочной перспективе. Более того, помимо адгезинов, как уже отмечалось, БВВ несут многие другие биоактивные молекулы, набор которых меняется в зависимости от условий среды. При этом выявить полный спектр соединений в составе БВВ пока не удастся [42], что ограничивает возможности исследований репертуара функций и оценки безопасности этих наноструктур.

Развитие омикс-технологий определило принципиальные возможности проведения анализа содержимого везикул. Однако существующие проблемы препаративного выделения и очистки БВВ [8], а также некоторые ограничения методов мульти-омикс-профилирования препятствуют получению точных данных [81]. Информация о полном спектре соединений в составе везикул и закономерностях его изменений в разных условиях среды отсутствует даже для классических, хорошо исследованных бактерий [82]. Более того, алгоритмы исследований функций и вирулентности везикул остаются пока нестандартизированными, что существенно затрудняет сравнение данных, по-

лученных разными исследовательскими коллективами, и проведение анализа безопасности БВВ [83]. Кроме того, в популяциях ВВ, секретируемых бактериальными штаммами, как уже отмечалось, обнаруживаются субпопуляции везикул, которые различаются в отношении размера и состава содержимого везикул. Специфические молекулярные маркеры для дифференциальной детекции субпопуляций ВВ пока не описаны ни для одного вида бактерий, что не позволяет исследовать динамику, состав и функции соответствующих наноструктур в разных условиях среды. Все опубликованные к настоящему времени данные — результаты исследований тотальных пулов БВВ, выделенных из сложных ассоциатов биосистем или аксеничных культур патогенных бактерий и комменсалов. Наконец, малые РНК БВВ отражают еще один уровень сложности в динамичном взаимодействии хозяин-патоген и рассматриваются сегодня наряду с белками как важный класс факторов вирулентности грамположительных и грамотрицательных бактерий [23]. Полученные данные указывают на то, что miRNA-подобная регуляция экспрессии ключевых сенсоров и регуляторов иммунитета, обнаруженная при исследовании взаимодействия БВВ с эукариотическими клетками, является общим механизмом взаимодействия бактерий с клетками высших организмов, обуславливающим патогенез или симбиоз [27, 58]. В этой связи профиль малых РНК в составе везикул и ответные реакции эукариотических клеток, ассоциированные с модуляцией транскриптомного профиля, должны быть в фокусе внимания исследователей функций везикул, анализа их токсигенности и, соответственно биобезопасности.

Нерешенная проблема безопасности БВВ в значительной мере компрометирует идею их клинического приложения. В этой связи ряд исследователей предлагает использовать для практических целей везикулы, продуцируемые комменсалами, которые имеют статус пробиотиков, как потенциально безопасные БВВ. Однако, поскольку все вышеуказанные проблемы также характерны и для ВВ пробиотиков, а проведение оценки безопасности самих пробиотических бактерий до сих пор не стандартизировано [84], подобный подход не представляется приемлемым.

Пока единственным безопасным практическим приложением БВВ может быть использование их в качестве диагностических маркеров [85]. Определение структуры микробиоты у человека на основании данных сиквенса ДНК, выделенной из БВВ биофлюидов, уже получило распространение в клинической практике [86]. Обогащенность БВВ малыми РНК открывает новые диагностические перспективы БВВ, в том числе возможность детекции изменений физиологических процессов у отдельных микроорганизмов и в микробных сообществах, модуляции структуры и

функций микробиоты человека, животных, растений, а также почвы, водных систем и регистрации сукцессии на основе сиквенса малых РНК в исследуемых образцах [47]. Технологии, которые позволяют этой возможности реализоваться в ближайшем времени, уже появились.

Новые технологии для практического приложения и оценки безопасности БВВ. Для оценки присутствия микробов в образцах сегодня используют два основных варианта геномных технологий — ДНК-сиквенс отдельных маркерных генов или их фрагментов, например, переменных областей 16S рРНК (16S рДНК-seq) [87], либо ДНК-сиквенс по методу дробовика (shotgun DNA-seq). К сожалению, оба варианта не позволяют оценить жизнеспособность, а также активность идентифицированных микроорганизмов, определить актуальные метаболические пути и оценить изменения биохимических процессов в микробных сообществах и биосистемах в ответ на стимул. Инновационный метод, основанный на глобальном секвенировании малых РНК в исследуемых образцах — sMETASeq (small RNA Metagenomics by Sequencing) [47] открывает возможность решения таких задач. При исследовании одного образца он позволяет проводить количественную и качественную оценку всего пула малых РНК, представленных в образце, и на основании сиквенсов РНК определять структуру микробного сообщества. В отличие от метагеномных методов, основанных на ДНК, sMETASeq позволяет: 1) получать информацию о составе живых активных организмов, а также происходящих в их клетках транскрипционных процессах; 2) исследовать взаимосвязь между малыми РНК организма хозяина и микробным составом, а также между структурой микробного сообщества и пулом малых РНК микробов и организма хозяина; наконец, (3) определять ответные реакции организма на конкретные стимулы, микроорганизмы или их компоненты.

Этот метод может использоваться для анализа различных типов образцов от биоптатов тканей до биофлюидов. Поскольку мишенью sMETASeq являются небольшие РНК (<50 нуклеотидов), то даже деградированные молекулы РНК в образце оказываются ценными для идентификации микробов в образце. Впрочем, локализация малых РНК в везикулах (как и связь с некоторыми белками) в значительной мере защищает эти молекулы от деградации [47, 88].

Обогащенность БВВ малыми РНК и стабильность этих молекул в составе везикул позволяет использовать их в качестве диагностических маркеров для оценки динамического равновесия процессов в живых системах, прогрессивных/регрессивных изменений экосистем, развития заболеваний у высших организмов и эффективности лечения [18, 47]. Применение sMETASeq для гло-

бального секвенирования малых РНК внеклеточных везикул, продуцируемых клетками микро- и макроорганизмов в сложных ассоциатах, и появление новых биоинформатических инструментов для анализа нуклеотидных последовательностей могут определить прорывные решения проблем мониторинга биосистем, разработки экспресс-теста изменений в экосистемах при селективном давлении биотических и абиотических стрессоров.

Первые работы в этом направлении уже появились. Недавно стартовал международный проект “AQUACOSM VIMS-Ehux” по изучению динамики внеклеточных везикул микроорганизмов в природных водных системах и определению факторов, влияющих на профиль везикул в окружающей среде [19]. Эти исследования основаны на анализе малых РНК БВВ. Они направлены на создание моделей распределения и функций БВВ в водной среде, актуальных для экологического и биогеохимического понимания изменения природных экосистем, и разработку эффективной системы реагирования. Наличие малых РНК в выделенных из морской воды везикулах микробов позволило авторам оценить интерференционный потенциал соответствующих молекул при действии разных факторов, а также определить таксономический профиль обитателей среды и, соответственно, охарактеризовать структуру и функции микробиоты. В рамках этой работы международной команды исследователей были получены уникальные данные, подтверждающие многоликость БВВ, неоднозначность роли везикул микроорганизмов в регуляции биосистем [19]. Авторы продемонстрировали, что вне селективного давления неблагоприятных факторов внеклеточные везикулы микроорганизмов водных экосистем благотворно влияют на физиологию клеток-продуцентов и способствуют стабильности микробиоты водной среды. Однако в условиях селективного давления биотических и/или абиотических стрессоров, индуцирующих развитие вирусной инфекции, везикулы, напротив, благоприятствуют инфекционному процессу, способствуют распространению инфекционного агента и глобальному изменению микробиома экосистемы. Эти результаты подчеркивают многогранность БВВ и необходимость сосредоточения усилий фундаментальной и прикладной науки на поиске решения проблемы, связанной с оценкой их безопасности. Развитие подходов, основанных на использовании инновационной технологии sMETASeq для модельных систем *in cellulo* и *in vivo*, может определить прогресс в решении проблемы оценки безопасности БВВ, нацеленных на практическое применение. Оптимальным базовым модельным организмом для проведения таких работ является *Caenorhabditis elegans* [89, 90], так как алгоритм оценки влияния БВВ в отношении этого организ-

ма уже разработан [91]. Относительная доступность соответствующего подхода позволяет надеяться на внедрение его в практику в самом ближайшем будущем.

БВВ транспортируют соединения широкого спектра и опосредуют межклеточную коммуникацию как внутри царства прокариот, так и между царствами прокариот и эукариот. Очевидно, что исследование этих наноструктур весьма актуально как для понимания механизмов выживания отдельных бактерий и сложных микробных сообществ в разных условиях среды, так и способов взаимодействия микро- и макроорганизмов, определяющих взаимную выгоду или фатальный исход, трансформацию комменсалов в патогены и развитие патологических процессов, а также для разработки мониторинга микробиоты экосистем и создания системы контроля появления новых патогенов, эмерджентных инфекций. Способность БВВ обеспечивать быструю адаптацию бактерий к неблагоприятным условиям, в том числе антимикробным препаратам, а также уничтожение бактерий-конкурентов открывает перспективы использования этих наноструктур для решения проблемы антибиотикоустойчивости. Способность БВВ преодолевать эпителиальные, эндотелиальные и гематоэнцефалические барьеры, вызывать эпигенетическую модификацию и иммунную модуляцию открывает перспективы применения их в таргетной терапии инфекционных и неинфекционных, в том числе онкологических заболеваний, в качестве лекарств и средств их доставки, а также вакцин. Однако для реализации этих практических приложений еще предстоит решить проблемы, связанные со стандартизацией выделения и очистки БВВ, анализа их структуры и функций, наконец, оценки безопасности *in vitro*, *in cellulo*, *in vivo*.

Преодоление соответствующих проблем требует объединения усилий представителей как фундаментальной, так и прикладной науки. Результаты этих усилий могут определить прорывные решения в медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии, фармакологии, а также экологии и открыть новые научные направления. Вместе с тем, безопасным и доступным практическим приложением уже сегодня может быть использование БВВ в качестве диагностических маркеров модуляции физиологических процессов у высших эукариот и динамических сдвигов в экосистемах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Woith E., Fuhrmann G., Melzig M.F. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 22. P. 5695. <https://doi.org/10.3390/ijms20225695>

2. *Bishop D., Work E.J.B.J.* // *Biochem. J.* 1965. V. 96. № 2. P. 567–576.
<https://doi.org/10.1042/bj0960567>
3. *Knox K., Cullen J., Work E.J.B.J.* // *Biochem. J.* 1967. V. 103. № 1. P. 192–201.
<https://doi.org/10.1042/bj1030192>
4. *Bladen H.A., Waters J.F.* // *J. Bacteriol.* 1963. V. 86. № 6. P. 1339–1344.
<https://doi.org/10.1128/jb.86.6.1339-1344.1963>
5. *Avila-Calderón E.D., Ruiz-Palma M.D.S., Aguilera-Arreola M.G., Veldzquez-Guadarrama N., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., et al.* // *Front Microbiol.* 2021. V. 12. P. 557902.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
6. *Briaud P., Carroll R.K.* // *Infect. Immun.* 2020. V. 88. e00433-20.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00433-20>
7. *Tarashi S., Zamani M.S., Omrani M.D., Fateh A., Moshiri A., Saedisomeolia A. et al.* // *J. Immunol. Res.* 2022. V. 2022. P. 8092170.
<https://doi.org/10.1155/2022/8092170>
8. *Xie J., Li Q., Haesebrouck F., Van Hoecke L., Vandembroucke R.E.* // *Trends Biotechnol.* 2022. V. 40. № 10. P. 1173–1194
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.005>
9. *Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Grygorieva T.Y., Trushin M.V. et al.* // *J. Proteomics.* 2014. V. 110. P. 117–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.020>
10. *Gaurivaud P., Ganter S., Villard A., Manso-Silvan L., Chevret D., Boulé C. et al.* // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 11. e0208160.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160>
11. *de Souza L.F.L., Campbell G., Arthuso G.G.S., Gonzaga N.F., Alexandrino C.R., Assao V.S. et al.* // *Braz. J. Microbiol.* 2022. V. 53. № 2. P. 1081–1084.
<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00726-0>
12. *Razin S., Hayflick L.* // *Biologicals.* 2010. V. 38. № 2. P. 183–190.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.008>
13. *Toyofuku M., Nomura N., Eberl L.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. № 1. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
14. *Mozahab N., Mingeot-Leclercq M.-P.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 600221.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600221>
15. *Potter M., Hanson C., Anderson A.J., Vargis E., Britt D.W.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 21289.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78357-4>
16. *Stanton B.A.* // *Genes (Basel).* 2021. V. 12. № 7. P. 1010.
<https://doi.org/10.3390/genes12071010>
17. *Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W. et al.* // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. № 6. e1005672.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>
18. *Pita T., Feliciano J.R., Leitão J.H.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 24. P. 9634.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249634>
19. *Schatz D., Schleyer G., Saltvedt M.R., Sandaa R.A., Feldmesser E., Vardi A.* // *ISME J.* 2021. V. 15. № 12. P. 3714–3721.
<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01018-5>
20. *Majdalani N., Vanderpool C.K., Gottesman S.* // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 40. P. 93–113.
<https://doi.org/10.1080/10409230590918702>
21. *Kumar P., Anaya J., Mudunuri S.B., Dutta A.* // *BMC Biol.* 2014. V. 12. P. 78.
<https://doi.org/10.1186/s12915-014-0078-0>
22. *Chen X., Sim S., Wurtmann E.J., Feke A., Wolin S.L.* // *RNA.* 2014. V. 20. № 11. P. 1715–1724.
<https://doi.org/10.1261/rna.047241.114>
23. *Diallo I., Provost P.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 5. P. 1627.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051627>
24. *Zhang H., Zhang Y., Song Z., Li R., Ruan H., Liu Q. et al.* // *Int. J. Med. Microbiol.* 2020. V. 310. № 1. P. 151356.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151356>
25. *Музыкантов А.А., Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф., Гомзикова М.О., Золотых М.А., Чернова О.А. и др.* // *Acta Naturae.* 2021. T. 13. № 4. C. 82–88.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11506>
26. *Cecil J.D., O'Brien-Simpson N.M., Lenzo J.C., Holden J.A., Chen Y.Y., Singleton W. et al.* // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 4. e0151967.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151967>
27. *Sahr T., Escoll P., Rusniok C., Bui S., Pehau-Arnaudet G., Lavieu G. et al.* // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 762.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28454-x>
28. *Turner L., Bitto N.J., Steer D.L., Lo C., D'Costa K., Ramm G. et al.* // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 1466.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01466>
29. *Gottesman S., Storz G.* // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. V. 3. a003798.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>
30. *Haning K., Cho S.H., Contreras L.M.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014. V. 4. P. 96.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00096>
31. *Острик А.А., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г.* // *Успехи биологической химии.* 2021. T. 61. C. 229–252.
<https://doi.org/10.31857/S0555109920040121>
32. *Stork M., Di Lorenzo M., Welch T.J., Crosa J.H.* // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 9. P. 3479–88.
<https://doi.org/10.1128/JB.00619-06>
33. *Michaux C., Verneuil N., Hartke A., Giard J.C.* // *Microbiol.* 2014. V. 160. P. 1007–1019.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.076208-0>
34. *Beisel C.L., Storz G.* // *Mol. Cell.* 2011. V. 41. P. 286–297.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.027>
35. *Stubbendieck R.M., Vargas-Bautista C., Straight P.D.* // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1234.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
36. *Ñahui Palomino R.A., Vanpouille C., Costantini P.E., Margolis L.* // *PLOS Pathogens.* 2021. V. 17. № 5. e1009508.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009508>
37. *Uddin M.J., Dawan J., Jeon G., Yu T., He X., Ahn J.* // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 5. P. 670.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050670>

38. Koeppen K., Nymon A., Barnaby R., Bashor L., Li Z., Hampton T.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2021. V. 118. № 28. e2105370118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105370118>
39. Muraca M., Putignani L., Fierabracci A., Teti A., Perilongo G. // *Discov. Med.* 2015. V. 19. № 106. P. 343–348.
40. Brameyer S., Plener L., Müller A., Klingl A., Wanner G., Jung K. // *J. Bacteriol.* 2018. V. 200. № 15. e00740-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00740-17>
41. Lee J., Lee E.Y., Kim S.H., Kim D.K., Park K.S., Kim K.P. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 6. P. 2589–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12>
42. Schaar V., Uddback I., Nordstrom T., Riesbeck K. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. № 1. P. 117–120. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt307>
43. Toyofuku M., Morinaga K., Hashimoto Y., Uhl J., Shimamura H., Inaba H. et al. // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 1504–1509. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.13>
44. Rueter C., Bielaszewska M. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. P. 91. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>
45. Zhao Z., Wang L., Miao J., Zhang Z., Ruan J., Xu L. et al. // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 806. P. 151403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151403>
46. Ahmadi Badi S., Moshiri A., Fateh A., Rahimi Jamnani F., Sarshar M., Vaziri F. et al. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01610>
47. Mjelle R., Aass K.R., Sjursen W., Hofslie E., Sætrom P. // *iScience*. 2020. V. 23. № 5. P. 101131. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101131>
48. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 44. P. 19002-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>
49. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. // *mBio*. 2021. V. 12. № 3. e0053421. <https://doi.org/10.1128/mBio.00534-21>
50. Kuipers M.E., Hokke C.H., Smits H.H., Nolte-’t Hoen E.N.M. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 12. № 9. P. 2182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02182>
51. Chang X., Wang S.L., Zhao S.B., Shi Y.H., Pan P., Gu L. et al. // *Mediators Inflamm.* 2020. V. 2020. P. 1945832. <https://doi.org/10.1155/2020/1945832>
52. Hua Y., Wang J., Huang M., Huang Y., Zhang R., Bu F. et al. // *Emerg. Microbes Infect.* 2022. V. 11. № 1. P. 1281–1292. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2065935>
53. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 15329. <https://doi.org/10.1038/srep15329>
54. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Malygina T.Y. et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. № 18. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny185>
55. Marsh J.W., Hayward R.J., Shetty A.C., Mahurkar A., Humphrys M.S., Myers G.S.A. // *Brief. Bioinform.* 2018. V. 19. № 6. P. 1115–1129. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx043>
56. Tulkens J., Vergauwen G., Van Deun J., Geurickx E., Dhondt B., Lippens L. et al. // *Gut*. 2020. V. 69. № 1. P. 191–193. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317726>
57. Bhattarai Y. // *Neurogastroenterol. Motil.* 2018. V. 30. № 6. e13366. <https://doi.org/10.1111/nmo.13366>
58. Diallo I., Ho J., Lambert M., Benmoussa A., Husseini Z., Lalaouna D. et al. // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. № 9. e1010827. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010827>
59. Yaghoufar R., Behrouzi A., Ashrafi F., Shahryari A., Moradi H.R., Choopani S. et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 22119. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79171-8>
60. Cuesta C.M., Guerri C., Ureña J., Pascual M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 8. P. 4235. <https://doi.org/10.3390/ijms22084235>
61. Rodrigues M., Fan J., Lyon C., Wan M., Hu Y. // *Theranostics*. 2018. V. 8. № 10. P. 2709–2721. <https://doi.org/10.7150/thno.20576>
62. Vdovikova S., Gilfillan S., Wang S., Dongre M., Wai S.N., Hurtado A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 7434. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25308-9>
63. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. // *Cell. Microbiol.* 2016. V. 18. № 11. P. 1508–1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
64. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. № 3. P. 171–84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>
65. Díaz-Garrido N., Badia J., Baldomà L. // *J. Extracell. Vesicles*. 2021. V. 10. № 13. e12161. <https://doi.org/10.1002/jev2.12161>
66. Wegh C.A.M., Geerlings S.Y., Knol J., Roeselers G., Belzer C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 19. P. 4673. <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>
67. Molina-Tijeras J.A., Gálvez J., Rodríguez-Cabezas M.E. // *Nutrients*. 2019. V. 11. № 5. P. 1038. <https://doi.org/10.3390/nu11051038>
68. Li M., Zhou H., Yang C., Wu Y., Zhou X., Liu H., Wang Y. // *J. Control. Release*. 2020. V. 323. P. 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
69. Gilmore W.J., Johnston E.L., Zavan L., Bitto N.J., Kaparakis-Liaskos M. // *Mol. Immunol.* 2021. V. 134. P. 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.02.027>
70. Nanou A., Zeune L.L., Bidard F.C., Pierga J.Y., Terstappen L.W.M.M. // *Breast Cancer Res.* 2020. V. 22. № 1. P. 86. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01323-5>
71. Kim O.Y., Dinh N.T., Park H.T., Choi S.J., Hong K., Gho Y.S. // *Biomaterials*. 2017. V. 113. P. 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.037>
72. Li Y., Wu J., Qiu X., Dong S., He J., Liu J. et al. // *Bioact. Mater.* 2022. V. 20. P. 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.05.037>
73. Chen Q., Bai H., Wu W., Huang G., Li Y., Wu M. et al. // *Nano Lett.* 2020. V. 20. № 1. P. 11–21. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02182>

74. *Bachmann M.F., Jennings G.T.* // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. № 11. P. 787–796.
<https://doi.org/10.1038/nri2868>
75. *Huang W., Zhang Q., Li W., Chen Y., Shu C., Li Q. et al.* // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1379.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01379>
76. *Macia L., Nanan R., Hosseini-Beheshti E., Grau G.E.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. P. 107.
<https://doi.org/10.3390/ijms21010107>
77. *Sierra G.V., Campa H.C., Varcacel N.M., Garcia I.L., Izquierdo P.L., Sotolongo P.F. et al.* // *NIPH. Ann.* 1991. V. 14. P. 195–210.
78. *Micoli F., MacLennan C.A.* // *Semin. Immunol.* 2020. V. 50. P. 101433.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101433>
79. *Koeberling O., Delany I., Granoff D.M.* // *Clin. Vaccine Immunol.* 2011. V. 18. № 5. P. 736–42.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00542-10>
80. *Peeters C.C., Rümke H.C., Sundermann L.C., Rouppe van der Voort E.M., Meulenbelt J., et al* // *Vaccine.* 1996. V. 14. № 10. P. 1009–1015.
[https://doi.org/10.1016/0264-410x\(96\)00001-1](https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00001-1)
81. *Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B.* // *J. Control. Release.* 2016. V. 234. P. 124–134.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.033>
82. *Camacho A.I., Irache J.M., de Souza J., Sánchez-Gómez S., Gamazo C.* // *Vaccine.* 2013. V. 31. № 32. P. 3288–3294.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.020>
83. *Hu C.M., Fang R.H., Luk B.T., Zhang L.* // *Nat. Nanotechnol.* 2013. V. 8. № 12. P. 933–938.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2013.254>
84. *Dehaini D., Wei X., Fang R.H., Masson S., Angsantikul P., Luk B.T. et al.* // *Adv. Mater.* 2017. V. 29. № 16. .
<https://doi.org/10.1002/adma.201606209>
85. *Wang D., Dong H., Li M., Cao Y., Yang F., Zhang K., et-Dai W., Wang C., Zhang X.* // *ACS Nano.* 2018. V. 12. № 6. P. 5241–5252.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08355>
86. *Ricci V., Carcione D., Messina S., Colombo G.I., D'Alessandra Y.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. P. 8959.
<https://doi.org/10.3390/ijms21238959>
87. *Hamady M., Knight R.* // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 7. P. 1141–1152.
<https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>
88. *Dauros-Singorenko P., Blenkiron C., Phillips A., Swift S.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. № 5. fny023.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fny023>
89. *Poupet C., Chassard C., Nivoliez A., Bornes S.* // *Front. Nutr.* 2020. V. 7. P. 135.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00135>
90. *Baenas N., Wagner A.E.* // *Genes Nutr.* 2019. V. 14. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/s12263-019-0641-y>
91. *George D.T., Behm C.A., Hall D.H., Mathesius U., Rug M., Nguyen K.C. et al.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. :e106085.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106085>

Extracellular Vesicles of Bacteria Mediate Intercellular Communication: Practical Applications and Biosafety (Review)

V. M. Chernov^a, A. A. Mouzykantov^a, *, N. B. Baranova^a, and O. A. Chernova^a

^a Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

*e-mail: muzaleksei@mail.ru

Extracellular vesicles, secreted by bacterial cells, are the focus of close attention of researchers. They are enriched with bioactive molecules, mediate the intercellular communication of micro- and macroorganisms, participate in the adaptation of bacteria to stressful conditions, reprogramming target cells, modulating immunoreactivity in higher organisms, changing the structure of microbial communities and ecosystems. The unique properties of bacterial extracellular vesicles (BEVs) open up broad prospects for their practical application – in clinical medicine, agriculture, biotechnology and ecology as diagnostic markers, vaccines, new biological products and means of their delivery. However, to implement the practical applications, a number of problems need to be solved. This review focuses on the ambiguous role of BEVs in the regulation of living systems, the problem of assessing the safety of BEVs and approaches to its solution related to innovative technologies.

Keywords: extracellular vesicles of bacteria, mediators of intercellular communication, small RNAs, practical applications, biosafety, innovative technologies, sMETASeq

УДК 663.12:606

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА САХАРОМИЦЕТОВ (ОБЗОР)

© 2023 г. С. А. Рябцева¹, *, А. Г. Храмцов¹, С. Н. Сазанова¹,
Р. О. Будкевич¹, Н. М. Федорцов¹, А. А. Везирян¹

¹Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, 355017 Россия

*e-mail: ryabtseva07@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2022 г.

После доработки 29.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Цель обзора – обобщение и анализ информации о молекулярно-генетических основах и методах исследования пробиотической активности грибов класса *Saccharomycetes*, механизмах их физиологического действия и применении в биотехнологии. В настоящее время эффективность *Saccharomyces boulardii* при лечении и для профилактики диарей различной этиологии, рецидивов инфекции *Clostridium difficile*, побочных эффектов терапии инфекции *Helicobacter pylori* установлена с высоким уровнем доказательности. Генетические, цитологические, культуральные и биохимические особенности *S. boulardii* определяют их пробиотическую активность. Другие штаммы сахаромидетов с пробиотическим потенциалом чаще всего выделяют из национальных ферментированных продуктов из растительного и молочного сырья. Единая методика исследования пробиотических свойств пока не создана, для их подтверждения необходимы клинические испытания с участием людей. Перспективными пробиотиками являются штаммы видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces marxianus*, имеющих международный статус безопасности. Возможные механизмы физиологического действия сахаромидетов включают антимикробные, антиоксидантные, трофические, антисекреторные и противовоспалительные эффекты. Некоторые механизмы пробиотического действия дрожжей отличаются от бактериальных и не все они пока понятны. Сахаромидеты-пробиотики могут быть использованы для повышения биологической ценности, качества и безопасности пищевых продуктов.

Ключевые слова: *Saccharomycetes*, *Saccharomyces boulardii*, пробиотики, методы исследований, механизмы действия, применение

DOI: 10.31857/S0555109923010087, **EDN:** DRZXFP

Сахаромидеты – это грибы класса *Saccharomycetes*, для которых характерны преимущественно одноклеточные формы существования, способность к почкованию и активной ферментации углеводов. Грибы с такими свойствами могут относиться и к другим классам, их часто называют дрожжами, хотя этот термин не имеет таксономического значения. История применения одного из видов сахаромидетов, *Saccharomyces cerevisiae*, в изготовлении хлеба, вина и пива насчитывает тысячелетия. К традиционным направлениям использования сахаромидетов относится также получение кисломолочных напитков смешанного брожения (например кефира), этилового спирта, пищевых и кормовых добавок. В биотехнологии эта группа микроорганизмов широко применяется в производстве биотоплива, различных ферментов, витаминов, липидов, органических кислот, а также в качестве клеточных моделей для генно-инженерных модификаций [1].

В последние десятилетия наблюдается рост интереса к антагонистическим свойствам дрожжей, их применению в фармацевтике и пищевой биотехнологии [2, 3]. Это связано с изменениями в представлениях о кишечном микробиоме, новыми данными о разнообразии входящих в него микроорганизмов. Кроме бактерий в экосистеме кишечника человека присутствуют также археи, грибы, вирусы и простейшие, роль которых пока изучена недостаточно [4]. Согласно данным, полученным в ходе выполнения международного проекта “Микробиом человека”, два из трех наиболее распространенных родов грибов в кишечнике человека, *Saccharomyces* и *Candida*, относятся к сахаромидетам [5]. Зная особенности их метаболизма, можно предположить, что они участвуют в синтезе биологически активных соединений, влияющих на процессы пищеварения и жизнедеятельности человека.

Согласно уточненному определению ФАО/ВОЗ, живые микроорганизмы, которые при употребле-

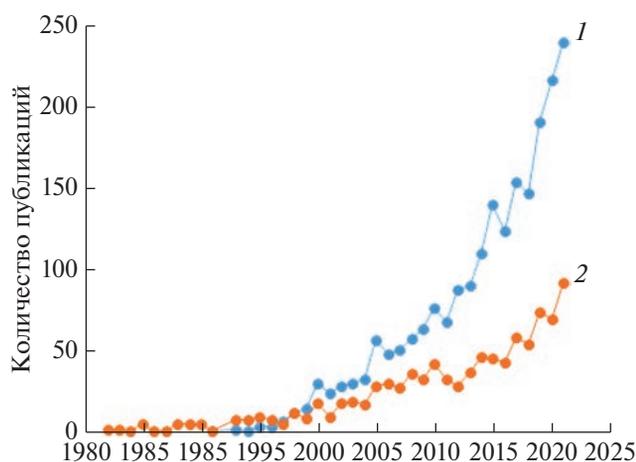


Рис. 1. Публикационная активность в системе PubMed по темам “дрожжи-пробиотики” (1, “yeast probiotic”) и “*Saccharomyces boulardii*” (2).

нии в достаточных количествах приносят пользу здоровью хозяина, называются пробиотиками. Основная группа таких хорошо изученных пробиотиков включает виды родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [6]. В настоящее время установлено, что пробиотические свойства могут проявлять и некоторые виды дрожжей, которые, принципиально отличаясь строением клетки и свойствами от бактерий-пробиотиков, могут дополнять их и даже иметь преимущества при отдельном использовании [2, 3].

Наиболее изученными пробиотиками небактериального происхождения являются сахаромицеты Буларди (*Saccharomyces boulardii*). Это единственный вид грибов, полезные свойства которого подтверждены многочисленными контролируруемыми клиническими исследованиями и более 60 лет применяются в медицине [7, 8]. Пробиотическая активность *S. boulardii* позволяет использовать их не только для лечения некоторых заболеваний, но и в производстве продуктов функционального питания [2, 3, 7, 8]. Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA) присвоило этим грибам статус QPS (Qualified Presumption of Safety) и разрешило добавлять их к пище или корму [10]. Во всем мире наблюдается рост интереса к сахаромицетам Буларди, однако еще более быстрыми темпами в последнее десятилетие увеличивается количество публикаций о пробиотических свойствах других видов дрожжей, что свидетельствует об актуальности этой темы (рис. 1).

Целью обзора является обобщение и анализ информации о молекулярно-генетических основах и методах исследования пробиотической активности грибов класса *Saccharomycetes*, механизмах их физиологического действия и применении в биотехнологии.

Методы исследований и молекулярно-генетические основы пробиотической активности *Saccharomyces boulardii*. История изучения грибов-пробиотиков началась в 20 гг. прошлого века, когда французский биолог Генри Булар (Henri Boulard) выделил чистую культуру дрожжей, обладавшую лечебными свойствами, исследовал ее и назвал *Saccharomyces boulardii*. Источником ее получения стала кожура тропических фруктов личи и манго-стина, напиток из которых помогал жителям Индокитая справиться с диареей во время эпидемии холеры [11]. В 1953 г. французская компания “Biocodex” приобрела права на эту культуру дрожжей и процесс их ферментации, а в 1961 г. зарегистрировала лиофилизированный штамм *S. boulardii* CNCM I-745 в качестве лекарственного препарата (история Biocodex <https://ru.biocodex.com/ru/biocodex-v-mire/nasledie/>).

В 1993 г. вид *S. boulardii* был представлен научному сообществу как новый биотерапевтический агент для профилактики и лечения диарей при различных заболеваниях. Основанием для этого стали результаты исследований на животных и данные, полученные при участии добровольцев и пациентов, которые показали эффективность и безопасность *S. boulardii* при пероральном приеме. Было подчеркнуто, что количество клеточек этих дрожжей быстро достигает в кишечнике высокого стабильного уровня, который сохраняется во время ежедневного приема препарата, а после его отмены клетки *S. boulardii* быстро выводятся из толстой кишки [12].

Позже молекулярно-генетическое типирование методом RFLP ПЦР-амплифицированных межгенных транскрибируемых спейсерных областей, включая рибосомную ДНК 5.8S, показало, что коммерческие штаммы *S. boulardii* являются аспорогенными штаммами вида *S. cerevisiae*, а не представителями отдельного вида [13]. Так как в настоящее время вопрос таксономической принадлежности сахаромицет Буларди окончательно не решен, употребляемое далее название *S. boulardii* обозначает коммерческие препараты дрожжей *Saccharomyces boulardii*, применяемые в медицине.

В 2007 году *S. boulardii* уже позиционировались как пробиотики. Показано, что некоторые отличия дрожжей от бактерий, такие как особенности строения клетки, большие размеры, устойчивость к антибиотикам и отсутствие способности ее приобретать, могут давать им преимущества при использовании в качестве пробиотиков. Новые данные клинических исследований подтвердили высокую эффективность применения *S. boulardii* при антибиотикоассоциированной диарее и рецидивирующих кишечных инфекциях *Clostridium difficile*, а также показали возможность использования *S. boulardii* для повышения иммунитета [14].

В 2010 г. были показаны отличия *S. boulardii* от *S. cerevisiae* по метаболическим и генетическим характеристикам. Устойчивость к повышенным температурам, низким значениям pH и антибактериальным препаратам позволяют *S. boulardii* выживать в условиях желудочно-кишечного тракта. Концентрация клеток *S. boulardii* при пероральном приеме здоровыми людьми достигает равновесия в кишечнике в течение 3 дней и выводится в течение 3–5 дней после прекращения приема. Метаанализ результатов контролируемых клинических испытаний с 1976 по 2009 г. с участием взрослых пациентов подтвердил эффективность препаратов *S. boulardii* при диареях, связанных с приемом антибиотиков и энтеральным питанием, инфекции *Clostridium difficile* и *Helicobacter pylori*, а также диареях путешественников. Приведены доказательства того, что потенциальные риски переноса генов устойчивости к антибиотикам, транслокации из кишечника в другие органы, сохранения в кишечнике, являются минимальными при приеме *S. boulardii*. Отдельные случаи фунгемии наблюдали у взрослых пациентов с серьезными сопутствующими заболеваниями и центральными венозными катетерами [11].

В 2015 г. опубликованы три систематических обзора с метаанализом, в которых показано, что препараты *S. boulardii* значительно улучшили первичную профилактику инфекций, вызванных *C. difficile* [15], повышали уровень эрадикации *H. pylori* до 80% (при 71% в контрольной группе) и уменьшили некоторые побочные эффекты, связанные с терапией [16], а также значительно снизили риск антибиотикоассоциированной диареи у детей (с 20.9 до 8.8%) и взрослых (с 17.4 до 8.2%) [17].

В статье [18] приведены данные доклинических и клинических исследований о влиянии *S. boulardii* CNCM I-745 на эпителий и ферментативные функции кишечника. Показано, что этот штамм сахаромикетов синтезирует и секретирует полиамины, которые играют роль в пролиферации и дифференцировке клеток мембраны щеточной каймы, усиливают экспрессию кишечных пищеварительных ферментов, а также переносчиков питательных веществ. Кроме того, *S. boulardii* CNCM I-745 выделяют ферменты, которые улучшают усвоение питательных веществ.

В 2020 г. [19] представлены результаты успешного применения *S. boulardii* CNCM I-745 для лечения и/или профилактики не только диарей различной этиологии, но и воспалительных заболеваний кишечника: синдрома раздраженного кишечника, кандидоза, дислипидемии и избыточного бактериального роста в тонкой кишке у пациентов с рассеянным склерозом. Приведены данные об отдельных случаях фунгемии, вызванных сахаромикетами, в том числе *S. boulardii* у больных с тяжелыми общими или кишечными заболевани-

ями и/или с постоянными катетерами. При этом отмечено, что в целом применение этих дрожжей-пробиотиков считается безопасным [19].

Вопросы безопасности *S. boulardii* рассмотрены также в другом обзоре [8]. Потенциальные проблемы применения бактерий-пробиотиков, связанные с переносом генов устойчивости к антибиотикам, возможным проникновением в эпителий кишечника и другие органы, не характерны или не выявлены для *S. boulardii*. Приведены данные рандомизированных и контролируемых клинических исследований, в которых не выявлено каких-либо серьезных побочных реакций при использовании *S. boulardii*. Фунгемия наблюдалась у некоторых тяжело больных людей с центральными венозными катетерами, причем такие пациенты хорошо реагировали на терапию противогрибковыми препаратами [8].

Метаанализ контролируемых исследований, опубликованный в 2021 г., подтвердил, что среди всех пробиотиков *S. boulardii* являются наиболее эффективными в снижении продолжительности острой диареи у детей и риска диареи продолжительностью более 2 дней [20].

Таким образом, в настоящее время эффективность пробиотиков *S. boulardii* при лечении острой диареи у взрослых и детей, рецидивов инфекции *C. difficile*, а также для профилактики антибиотикоассоциированной диареи, диареи путешественников, побочных эффектов эрадикационной терапии инфекции *H. pylori* установлена с высоким уровнем доказательности [21].

При этом до сих пор остается спорным вопрос о таксономическом положении сахаромикетов Буларди. Изначально они рассматривались как отдельный вид дрожжей, штамм которого (*S. boulardii* CNCM I-745) в 1989 г. был депонирован в Институте Пастера в Париже (История Biocodex <https://ru.biocodex.com/ru/biocodex-v-mire/nasledie/>). При исследовании генетических характеристик с использованием ПЦР-электрофоретического кариотипирования и секвенирования рНК ученые пришли к выводу, что *S. boulardii* является штаммом *S. cerevisiae*, известных хлебопекарных и пивных дрожжей [22]. Геномное родство этих грибов составляет 99%, они похожи по многим фенотипическим и биохимическим свойствам, но выявлены и существенные отличия, поэтому сахаромикеты Буларди некоторые ученые рассматривают как вариант (*S. cerevisiae* var. *boulardii*) [22–24].

S. boulardii отличается от *S. cerevisiae* более высокой скоростью роста при 30 и 37°C, повышенной устойчивостью к температуре и изменению pH [2, 3, 8, 14, 23, 24]. Например, *S. boulardii* показали 65%-ную выживаемость при 52°C через 1 ч и 75%-ную выживаемость при pH 2.0 через 1 ч (по сравнению с 45 и 30% у *S. cerevisiae* W303 соответ-

ственно) [23]. Было установлено, что пробиотики *S. boulardii* отличаются от других штаммов *S. cerevisiae* генетическими характеристиками: трисомией хромосомы IX, отсутствием элементов ТУ1/2, количеством копий отдельных генов, ответственных за синтез белков и ответ на стресс, которые определяют способность к псевдогифальному переключению при ограничении азота, диплоидию, отсутствие спорообразования и повышенную устойчивость к низким значениям pH [24].

Клеточная стенка сахаромидетов состоит из бета-глюканов и маннанов, которые могут положительно влиять на кишечный микробиом, стимулировать врожденный и приобретенный иммунитет, адсорбировать микотоксины [25]. Установлены антиоксидантные и антипролиферативные свойства экстрактов полисахаридов клеточной стенки *S. boulardii*, причем нерастворимый глюкан показал высокое ингибирование роста клеток коло ректального рака [26].

Как и все сахаромидеты, *S. boulardii* являются хемоорганогетеротрофами, могут расти в аэробных и анаэробных условиях. *S. boulardii* сбраживают глюкозу, сахарозу, мальтозу и раффинозу, как и *S. cerevisiae*, но не могут сбраживать галактозу [27]. *S. boulardii* расщепляют пектин и целлобиозу, ассимилируют холестерин и не обладают целлюлазной активностью, как и многие штаммы *S. cerevisiae*, но, в отличие от них, не способны использовать инулин, мелибиозу, ксилан, трегалозу и бета-глюкан. *S. boulardii* вырабатывают эстеразу С4, липазу С14, лейцинариламидазу, кислую фосфатазу и фосфогидролазу, но не щелочную фосфатазу, валинариламидазу, цистинариламидазу, трипсин и химотрипсин [28].

Пробиотики *S. boulardii* показывают большую стрессоустойчивость, в 6–10 раз более высокий антиоксидантный потенциал по сравнению с *S. cerevisiae* ВУ4742. Их внеклеточная фракция содержит ценные флавоноиды, фенолы и полифенольные метаболиты [29]. Показано, что антибактериальная активность *S. boulardii* связана с их способностью продуцировать при 37°C необычно высокие для дрожжей уровни уксусной кислоты. Такая способность была обнаружена у всех исследованных штаммов этого вида, в отличие *S. cerevisiae*. Присутствие двух копий аллеля *whi2S287*, по-видимому, вызывает чувствительный к температуре дефект утилизации ацетата, приводящий к непрерывному, очень высокому накоплению уксусной кислоты [30].

При расшифровке полных геномов 5 пробиотических штаммов *S. boulardii* и сравнении их с геномами 145 штаммов *S. cerevisiae* было установлено отсутствие мобильных элементов Ту1, Ту3 и Ту4, генов переносчиков гексозы НХТ11 и НХТ9 и утилизации аспарагина, а также найдены разли-

чия в периодах и количестве копий повторов генов флоккулинов. Эти особенности связывают с повышенной стрессоустойчивостью и адгезивными свойствами [31]. Транскриптомные различия, демонстрируемые *S. cerevisiae* и *S. cerevisiae* var. *boulardii* в модели кишечной среды, могут быть причиной проявления пробиотических свойств и зависеть от дифференциальной регуляции экспрессии, основанной на изменчивости промотора [32].

Некоторые цитологические, культуральные и биохимические особенности *S. boulardii*, которые могут влиять на их пробиотическую активность и возможность применения в биотехнологии, обобщены в табл. 1 (приведены свойства, характерные для большинства сравниваемых микроорганизмов и штаммов *S. boulardii*).

Таким образом, *S. boulardii* имеют близкое генетическое родство с другими штаммами *S. cerevisiae*, но отличаются некоторыми существенными физиологическими и биохимическими свойствами, поэтому рассматриваются как штамм или вариант этого вида. В научных публикациях последнего десятилетия чаще всего используют название *S. cerevisiae* var. *boulardii*, однако встречается и обозначение штамма (*S. cerevisiae* HANSEN CBS 5926) или подтипа (*S. cerevisiae* subtype *boulardii*). Применяется и просто название вида *S. boulardii*, при этом обычно (но не всегда) подразумевается пробиотический штамм CNCM I-745, ставший эталоном сравнения в различных исследованиях.

Источники выделения и методы исследований других сахаромидетов с пробиотическими свойствами. Результаты исследований *S. boulardii* стимулировали поиск других видов дрожжей с пробиотическими свойствами. Методология выделения и исследования свойств новых штаммов дрожжей-пробиотиков продемонстрирована учеными университета Кастилии-Ла-Манча (Испания) в публикациях последних лет [28, 33–37]. поэтапный подход включал выделение дрожжей из различных пищевых сред (винзаводы, вино, сырзаводы, рассолы сыров, ферментированные овощи и др.), их идентификацию до уровня штаммов с помощью метода RAPD-PCR, общий скрининг пробиотических способностей (устойчивость в условиях пищеварения *in vitro*, в том числе влияние времени, температуры, pH и ферментов на кинетические параметры роста), определение способности к самоагрегации, гидрофобности и образованию биопленки, исследование устойчивости к антибиотикам и антимикробной активности, изучение жизнеспособности в условиях модели последовательного пищеварения “слонно-желудочный-кишечный тракт”. В результате были отобраны потенциальные пробиотики, в том числе наиболее перспективные штаммы видов *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora osmophila* и *Pichia kudriavzevii* [33, 34].

Таблица 1. Отличительные свойства *S. boulardii*

Свойства	Влияние на физиологические и технологические характеристики
Общие для грибов (отличие от бактерий-пробиотиков)	
Клетки крупнее (диаметр около 10 мкм), чем бактерии (1 мкм)	Создают стерические помехи, перекрывают сайты прикрепления патогенов и возбудителей порчи
Клеточная стенка отличается от бактерий, содержит бета-глюканы и маннаны	Место прикрепления и нейтрализации клеток бактерий-патогенов, возбудителей порчи и токсинов. Питательные вещества для нормальной микрофлоры
Устойчивость к антибиотикам	Выживание при антибиотикотерапии, отсутствие переноса генов устойчивости к антибиотикам
Особенности <i>S. boulardii</i> (отличие от <i>S. cerevisiae</i>)	
Повышенная устойчивость к температуре, более высокая скорость роста при 30 и 37°C	Способность выживать и конкурировать с другими микроорганизмами в ЖКТ. Быстрый рост при промышленном производстве
Повышенная устойчивость к изменению pH, в т.ч. кислой среде (выживание при pH 2)	Способность выживать в ЖКТ. Сохранение жизнеспособности в кислых пищевых продуктах, в т.ч. кисломолочных
Повышенная способность к синтезу уксусной кислоты	Пробиотические свойства. Подавление патогенов и возбудителей порчи пищевых продуктов
Повышенный синтез антиоксидантов	Пробиотические свойства. Обогащение пищевых продуктов антиоксидантами
Повышенный синтез флоккуллина	Повышенная стрессоустойчивость, адгезия патогенов и токсинов

Следующим этапом исследований стала оценка безопасности выделенных культур, которая включала тесты на устойчивость к антибиотикам и противогрибковым препаратам, продукцию биогенных аминов, активность деконъюгации солей желчных кислот и ферментативную активность. Установлено, что ни один из 20 изученных штаммов не продемонстрировал коагулазную, гемолитическую или ДНКазную активность, но все они проявляли чувствительность к противогрибковым средствам. Все штаммы показали устойчивость к антибиотикам и протеазную активность, некоторые, относящиеся к видам *S. cerevisiae* и *P. anomala* (актуальное название *Wickerhamomyces anomalus*), проявили фосфолипазную активность, а половина штаммов была способна конъюгировать желчные соли [35].

Еще одной стадией этой работы стало уточнение функциональных и технологических характеристик отобранных штаммов по следующим показателям: адгезия к клеткам Сасо-2/ТС7, метаболизм олиго- и полисахаридов (мелибиозы, раффинозы, ксилана, трегалозы, пектина, бета-глюкана, целлюлозы, целлобиозы и инулина) в аэробных и анаэробных условиях, ассимиляция холестерина, ферментативная активность, антиоксидантная активность, устойчивость к антимикотикам. Наиболее перспективными для использования в качестве пробиотиков были признаны штаммы видов *Hanseniaspora osmophila*, *Lachancea thermotolerans* и *S. cerevisiae* [28].

В недавно опубликованном обзоре [3] обобщены сведения о новых источниках выделения и штаммах дрожжей с пробиотическими свойствами (в основном 2015–2020 гг.). Самое большое количество таких штаммов принадлежит видам *S. cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, реже упоминаются другие виды сахаромикетных грибов (*Meyerozyma caribbica*, *Metschnikowia ziziphicola* (актуальное название *Metschnikowia pulcherrima*), *Hanseniaspora osmophila*, *Kluveromyces marxianus*, *Candida orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *Pichia guilliermondii* (актуальное название *Meyerozyma guilliermondii*), *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, *Lachancea thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica*). Много потенциальных пробиотических штаммов было выделено из ферментированных оливок, сока сахарного тростника, молока и молочных продуктов [3]. Новые данные по этой теме, опубликованные в 2021 и начале 2022 гг., систематизированы в табл. 2.

Почти все дрожжи, описанные в табл. 2, относятся к классу сахаромикетов (за исключением *Aureobasidium proteae* и *Rhodotorula mucilaginosa*). Дрожжи-пробиотики часто выделяют из национальных спонтанно ферментированных продуктов растительного происхождения, в этом отношении представляют интерес также сыры и кисломолочные продукты. Наиболее перспективными пробиотиками являются штаммы видов, имеющих международный статус безопасности, *S. cerevisiae* и *K. marxianus*.

Таблица 2. Виды, источники и свойства потенциальных пробиотиков

Вид (источник выделения)	Установленные пробиотические свойства	[]
<i>Diutina rugosa</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Aureobasidium proteae</i> (фисташки, Испания)	Выживаемость в условиях желудочно-кишечного тракта, способности к аутоагрегации, гидрофобность клеточной поверхности, поведение в условиях последовательного моделирования пищеварения, способность образовывать биопленку и ассимиляция источников углерода	[36]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Diutina rugosa</i> (цветы и плоды бразильского леса)	Устойчивость к ЖКТ, способность к аутоагрегации, гидрофобность, способность образовывать биопленку	[37]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> *, <i>Candida orthopsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> (ферментированные оливки, Бразилия)	Безопасность, выживаемость в желудочно-кишечном тракте, антимикробная активность, клеточная гидрофобность, способности к аутоагрегации и адгезии к эпителиальным клеткам, коагрегации и подавлению адгезии болезнетворных бактерий	[38]
<i>Yarrowia lipolytica</i> (морская вода, Мексика)	Антиоксидантная способность и антимикробная активность <i>in vitro</i> . Улучшение иммунологических показателей сыворотки крови, кожно-слизистой оболочки, кишечника и лейкоцитов рыб при контрольном заражении <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[39]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ферментированные зерновые продукты, Италия)	Устойчивость к условиям ЖКТ. Высокая фитазная и антиоксидантная активность, синтез феноловых кислот, антоцианов, пропионовой кислоты, изомеров конъюгированной линолевой кислоты. Противовоспалительная способность (на мононуклеарных клетках периферической крови человека, снижение провоспалительного цитокина IL-1 β)	[40], [41]
<i>Zygosaccharomyces saepe</i> (мисо, традиционная японская пища, полученная путем ферментации соевых бобов, риса, пшеницы или смеси из них)	Штамм I-6 индуцировал фенотипические изменения дендритных клеток костного мозга с повышением IL-10, противовоспалительное действие при колите, вызванном декстрансульфатом натрия (в мезентериальных лимфатических узлах мышей <i>in vitro</i> и на мышцах)	[42]
<i>Saccharomyces boulardii</i> (тесто идли, основного индийского продукта питания, из риса и черного маша)	Высокая устойчивость к солям желчных кислот, пепсину и ферменту поджелудочной железы, низким значениям pH, устойчивость к антибиотикам, способность к аутоагрегации и коагрегации, гидрофобность в модели кишечника <i>C. elegans in vitro</i> и <i>in vivo</i> . Антимикробная активность в отношении 13 различных энтеропатогенов, комменсальные отношения с пятью пробиотическими штаммами	[43]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (болло, традиционная ферментированная еда из пшеницы или пшеницы и пальчатого проса, Индия)	Толерантность к высокой концентрации желчных солей и кислой среде, резистентность к различным антибиотикам, высокая гидрофобность, безопасность (отсутствие гемолиза, активность ДНКазы и желатиназы), антибактериальная активность в отношении патогенов, высокая активность удаления свободных радикалов DPPH, противовоспалительная активность, антидиабетическая активностью, ферментативная активность (α -амилаза, липаза, β -галактозидаза)	[44]

Таблица 2. Окончание

Вид (источник выделения)	Установленные пробиотические свойства	[]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (медоносные пчелы, Тайланд)	Способность к росту в условиях симуляции желудочно-кишечного тракта, при pH 2.0–2.5, 0.3% солей желчных кислот и 37°C, аутоагрегации, продуцированию противомикробных веществ	[45]
<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> (сыры, Китай)	Продуцирование γ -аминомасляной кислоты, высокая способность к аутоагрегации, гидрофобность (вариация 40–92%), способность выживать в желудочно-кишечном тракте (выживаемость >75% после моделирования)	[46]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (ферментированные пищевые продукты и напитки, Тайвань)	Толерантность к солям желчных кислот и кислоте, гидрофобность клеточной поверхности, аутоагрегация, антиоксидантная активность и активность β -галактозидазы	[47]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (молоко яка, Индия)	Способность продуцировать β -галактозидазу, толерантность к условиям желудочно-кишечного тракта (низкий pH, панкреатин, пепсин и соли желчных кислот), гидрофобность клеточной поверхности, способность к аутоагрегации. Бесклеточный экстракт и супернатант улучшили сенсбилизацию к инсулину, проявили антиадипогенную способность и антиоксидантную активность, супернатант показал цитотоксическое действие на клетки колоректального рака SW-480	[48]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (кефир, Корея)	Безопасность штаммов <i>in vitro</i> (способность к гидролизу желатина, образованию псевдогиф и гемолизу), <i>in vivo</i> на мышах. Данные по уровню интерлейкина-6 свидетельствуют о противовоспалительном потенциале	[49]
<i>Pichia kluyveri</i> , <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Wickerhamomyces anomalus</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Candida boidinii</i> , <i>C. diddensiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (рассол для ферментации оливок, Италия)	Рост при 37 °C, низких значениях pH, в присутствии желчных солей, ферментативная активность (β -глюкозидаза и фитаза), индекс жизнеспособности при переваривании <i>in vitro</i>	[50]

* Актуальное название *Meyerozyma guilliermondii*.

Во многих работах подчеркнута строгая зависимость пробиотических свойств от штамма. Действительно, только часть выделенных штаммов дрожжей показывали способность выживать в условиях ЖКТ, еще меньше проявляли антибактериальную активность и имели другие полезные характеристики. Например, из 108 отобранных штаммов дрожжей 25 выдержали тесты на выживание в ЖКТ (температура, pH и др.), 10 из них показали способность к самоагрегации и гидрофобность, а 2 штамма проявили способность к образованию биопленки и жизнеспособность в модели ЖКТ [33]. В других работах наблюдалась та же тенденция: из 142 исследованных штаммов в качестве потенциальных пробиотиков были отобраны 3 [34], из 139 – 2 [40, 41], из 42 – 4 [44], из 104 – 4 [45].

Следует отметить, что в разных работах приводится разный перечень определяемых показателей, так как единой общепризнанной методологии оценки пробиотических свойств дрожжей пока не выработано. Более того, возникает вопрос о необходимости изучения адгезии, аутоагрегации, формирования биопленок и др. свойств, которые обычно исследуют у бактерий-пробиотиков для подтверждения их способности прикрепляться к стенкам кишечника и колонизировать их. Для дрожжей-пробиотиков это свойство может оказаться не обязательным, т. к. у них могут быть другие механизмы полезного действия. Так, у эталонных пробиотиков *S. boulardii* обнаружена самая низкая способность к адгезии по сравнению с 10 штаммами *S. cerevisiae* и 10 штаммами

других видов дрожжей с пробиотическими свойствами [28].

Во всех случаях в качестве положительного контроля использовали штамм с доказанной пробиотической активностью (*S. boulardii* CNCM I-745), причем многие штаммы других видов показали даже лучшие пробиотические характеристики *in vitro*, по сравнению с контролем. Однако для подтверждения возможности использования штамма микроорганизма в качестве пробиотика этого недостаточно, необходимы также испытания *in vivo* на лабораторных животных и рандомизированные контролируемые клинические исследования с участием людей. Только один штамм *S. boulardii* CNCM I-745 полностью прошел все этапы и имеет подтвержденный статус лекарственного средства и пробиотика.

Основные механизмы пробиотического действия сахаромикетов. В настоящее время наиболее изучены механизмы действия штамма *S. boulardii* CNCM I-745. В обзоре 2010 г. выделены 7 взаимосвязанных эффектов этого пробиотика [11]:

– антитоксический эффект (действует в качестве рецептора для связывания или расщепляет патогенные токсины);

– антимикробная активность (препятствует прикреплению патогенов к участкам кишечных рецепторов, связывает и ингибирует рост клеток патогенов, способствует укреплению целостности плотных контактов между энтероцитами и снижению транслокации патогенов);

– модуляция кишечной флоры (не влияет на нормальную микробиоту у здоровых людей, но при нарушении быстро ее восстанавливает);

– метаболическая активность (стимулирует синтез короткоцепочечных жирных кислот, восстанавливает пути транспорта жидкости);

– влияние на ферментативную активность кишечника;

– повышение уровня sIgA и IgG;

– воздействие на клеточные сигналы и снижение синтеза воспалительных цитокинов.

Результаты исследований, проведенных в последующее десятилетие, подтвердили и дополнили представления о вышеперечисленных эффектах. Новые данные о влиянии *S. boulardii* CNCM I-745 на организм при инфекционных заболеваниях позволили выделить два основных потенциальных механизма действия этого штамма: влияние на энтеропатогенные микроорганизмы (адгезия бактерий, их уничтожение и/или воздействие на их вирулентные факторы) и прямое воздействие на слизистую оболочку кишечника (трофические эффекты, влияние на восстановление эпителия, антисекреторные эффекты, противовоспалительные эффекты, иммуномодуляция) [51]. В этой работе подробно рассмотрены возможные механизмы

профилактического и/или лечебного эффекта при заболеваниях, вызванных *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, ротавирусом, *Entamoeba histolytica*, *Shigella flexneri*, патогенными штаммами *Escherichia coli* [51].

В проявлении лечебных и профилактических эффектов пробиотиков важную роль играют их метаболиты. *S. boulardii* отличается от *S. cerevisiae* повышенной выработкой уксусной кислоты, которая не только частично определяет антимикробную активность, но и положительно влияет на пролиферацию бокаловидных, Т-регуляторных клеток кишечника и секрецию слизи, ингибирует провоспалительный цитокин CXCL8 и служит субстратом для производства бутирата микробиотой кишечника [30]. Кроме того, *S. cerevisiae* var. *boulardii* обладает высоким антиоксидантным потенциалом, во внеклеточном пространстве обнаружено в 70 раз больше фенолов и в 20 раз больше флавоноидов, чем в образцах с *S. cerevisiae* [29].

Большое значение имеет также влияние *S. boulardii* CNCM I-745 на пищеварительные ферменты мембраны щеточной каймы кишечного эпителия. В работе [18] показано, что этот штамм синтезирует и секретирует полиамины, которые играют роль в пролиферации и дифференцировке эпителиальных клеток, усиливают экспрессию пищеварительных ферментов, а также переносчиков питательных веществ. Вероятный механизм связан с индукцией передачи сигналов посредством митоген-активируемого протеинкиназного пути. Увеличение активности щелочной фосфатазы, вызванное *S. boulardii*, может приводить к инактивации токсинов и уменьшению выработки воспалительных цитокинов. Кроме того, *S. boulardii* выделяют ферменты, которые улучшают усвоение питательных веществ микробиотой кишечника и самим хозяином [18]. Сахаромикеты рода *Kluyveromyces* вырабатывают активные бета-галактозидазы, необходимые людям с непереносимостью лактозы, и благодаря этому могут рассматриваться как пробиотики [52].

Антагонистические свойства дрожжей могут быть объяснены конкуренцией за питательные вещества, изменением pH среды в результате ускорения ионного обмена или образования органических кислот, образованием этанола, секрецией антимикробных соединений, в том числе микоцинов (киллер-токсинов) [2].

Микоцинами называют внеклеточные белки или гликопротеины, которые нарушают функцию клеточной мембраны у восприимчивых дрожжей, проявляя фунгицидное или фунгистатическое действие. К образованию микоцинов способны многие виды сахаромикетных грибов, в том числе представители родов: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*,

Torulopsis, *Williopsis* и *Zygosaccharomyces*. К возможным механизмам действия киллер-токсинов относят нарушение деления клеток путем блокирования синтеза ДНК, ингибирование синтеза компонента клеточной стенки β -1,3-глюкана и нарушение ионообмена, вызванного образованием каналов на цитоплазматической мембране [53].

В некоторых публикациях последних лет рассматривают микоцины как синтезированные дрожжами вещества, которые могут ингибировать рост не только грибов, но и бактерий, паразитов и вирусов. Микоцины проявляют минимальную токсичность и не вызывают резистентности, поэтому считаются перспективной заменой некоторых фунгицидных средств и антибиотиков [54].

В настоящее время накоплены многочисленные доказательства способности некоторых дрожжей подавлять рост и вирулентность патогенных бактерий, в том числе возбудителей алиментарных заболеваний и бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов. В частности, установлена антилистериальная активность штаммов *Geotrichum candidum*, *K. marxianus*, *Pichia norvegensis*, *P. fermentans*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida intermedia*, *C. tropicalis* и *Wickerhamomyces anomalus*. Некоторые штаммы *C. bombicola* могут ингибировать рост *Staphylococcus aureus* и *C. albicans*, а штаммы *D. hansenii* проявляют активность против *Clostridium tyrobutyricum* и *C. butyricum* [2].

Показана способность штамма *S. cerevisiae* CNCM I-3856 уменьшать патогенные эффекты энтеротоксигенного (ЕТЕС) штамма *Escherichia coli* Н10407, что связывают со снижением продукции энтеротоксина, стимуляцией роста *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в различных отделах кишечника, синтеза короткоцепочечных жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной) и этанола [55].

Ингибирование роста других патогенов, *Salmonella arizonae* и *S. typhimurium*, наблюдали в среде, ферментированной *Kluveromyces lactis* и *Saccharomyces unisporus*. Эти дрожжи являются частью симбиоза кефирных грибков и могут продуцировать ряд антимикробных метаболитов: спирт, кателицидин, ксантиндегидрогеназа, муцин-1, лактадгерин, лактопероксидаза, сывороточный амилоид А и лактотрансферрин. К возможным механизмам противосальмонеллезного действия относят также прилипание клеток сальмонелл к клеточным стенкам дрожжей [56].

Некоторые механизмы пробиотического действия дрожжей отличаются от бактериальных, и не все они пока понятны. Антимикробная активность связана в основном с прилипанием патогенов к дрожжевым клеткам, а конкуренцией за места связывания эпителия не с патогенами. Определены молекулярные массы некоторых белков, отвечающих за нейтрализацию токсинов, но какие это белки и какими генами они кодируются

пока неизвестно. Предстоит выяснить и точный механизм взаимодействия дрожжей с иммунными клетками [8, 19, 51]. Однако основные доказанные полезные для здоровья эффекты сахаромицетов, показанные на рис. 2, позволяют использовать их в медицине, фармацевтической и пищевой биотехнологии.

Возможности применения сахаромицетов в качестве пробиотиков и защитных культур в пищевой биотехнологии. Результаты изучения пробиотических свойств *S. boulardii* и присвоение им международного статуса безопасной пищевой и кормовой добавки инициировали рост интереса к использованию этого и других видов сахаромицетов в пищевой промышленности. Прежде всего это касается ферментированных продуктов из растительного сырья, имеются также данные о применении *S. boulardii* в молочной отрасли [7, 9, 57].

Использование *S. boulardii* для ферментации экстракта рисовых отрубей позволило обогатить его функциональными метаболитами, в том числе феруловой кислотой, и повысить биодоступность полезных веществ. В ячменном солодовом сусле эти дрожжи синтезировали олигосахариды с пребиотическими свойствами, а в соевом молоке — биоактивные изофлавоны, витамины группы В. После ферментации соков из моркови, свеклы, томатов и ягод наблюдали повышение их антиоксидантной активности [7].

Проростки фасоли и чечевицы из семян, замоченных в инокуляте *S. cerevisiae* var. *boulardii*, оказались хорошими носителями для этих пробиотиков с высокой концентрацией клеток (10^7 КОЕ/г) и повышенной выживаемостью в условиях пищеварительного тракта человека и при низких температурах хранения. На проростках с *S. boulardii* обнаружено на 99% меньше плесеней, отмечено также снижение количества колиформных бактерий [58].

S. cerevisiae var. *boulardii* CNCM-1745 значительно повысили жизнеспособность пробиотиков *Lactobacillus rhamnosus* GG в кофейных напитках в течение 14 недель хранения при 4 и 25°C [59]. Предложено использовать *S. boulardii* для получения пробиотических видов кваса [60], безалкогольного и крафтового пива с повышенной антиоксидантной активностью [61, 62].

Совместная ферментация *S. boulardii* с молочнокислыми микроорганизмами приводит к обогащению продуктов витаминами и повышению их антиоксидантной активности, а также стимулирует развитие и улучшает выживаемость бактерий-пробиотиков при хранении продуктов (в основном благодаря синтезу аминокислот и нейтрализации кислой среды). Количество *S. boulardii* может резко увеличиться в молочных продуктах с сахаром и фруктово-ягодными наполнителями, что приводит к образованию CO_2 и других метаболитов.



Рис. 2. Основные эффекты сахаромыцетов-пробиотиков.

Происходящие при этом изменения консистенции и вкуса считаются признаками порчи для традиционных кисломолочных продуктов [7, 9]. Внесение инулина способствует повышению выживаемости *S. boulardii* в синбиотическом йогурте и положительно влияет на его консистенцию [63].

Выделенные из сыра канастра штаммы *K. lactis* B10 и *Torulaspora delbrueckii* B14, которые показали пробиотический потенциал (устойчивость к имитированным условиям желудочно-кишечного тракта, самоагрегация, гидрофобность, ингибирование патогенов, устойчивость к антибиотикам и продукция β -галактозидазы), использовали для производства сыра. Хроматографический анализ образцов сыра позволил идентифицировать 38 летучих соединений, в том числе ароматические и функциональные метаболиты: 2,3-бутандиол, 2-фенилэтанол и изоамиловый спирт, изоамилацетат и фенэтилацетат [64].

Несколько штаммов сахаромыцетов со способностью продуцировать гамма-аминомасляную кислоту, которая обладает физиологическими свойствами (снижение артериального давления, ускорение синтеза белка в головном мозге, лечение бессонницы и депрессии), применяли для созревания сыров [46]. Сыр с *S. cerevisiae* DL6-20 отличался выраженным приятным ароматом, в нем обнаружены высокие концентрации изоамилового спирта, этилового эфира гексановой кислоты, бензилового спирта, этилового эфира октановой кислоты, 3-гидрокси-2-бутанона и гексановой кислот [46].

Ферментация сахаромыцетами Буларди смеси для мороженого не только обогащает ее пробиотиками, витаминами и антиоксидантами, но и способствует повышению взбитости смеси, снижению калорийности и обеспечению высоких микробиологических показателей готового продукта [65].

К преимуществам *S. boulardii* и некоторых других пробиотических дрожжей относятся их биозащитные свойства: способность разлагать микотоксины, такие как афлатоксины, патулин, охратоксин А и др. [3, 4, 9]. Недавно было показано, что лиофилизация и инкапсуляция улучшили способность *S. boulardii* RC009 к коагрегации с патогенами *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* и *S. haemolyticus*, а также к адсорбции афлатоксина B₁ [66].

Данные о полезных для здоровья свойствах сахаромыцетных грибов соответствуют представлениям о “биотиках”, которые продолжают развиваться [67]. Признанным пробиотиком является штамм *S. boulardii* CNCM I-745, активность и безопасность которого подтверждена многочисленными, в том числе и клиническими исследованиями. К наиболее доказанным свойствам этого штамма относится способность восстанавливать нормальную микрофлору после антибиотикотерапии, подавлять развитие патогенных микроорганизмов, оказывать антитоксический эффект, стимулиро-

вать выработку короткоцепочечных жирных кислот и пищеварительных ферментов эпителием кишечника, модулировать иммунный ответ. Эти свойства определяются как структурными особенностями генома, так и транскриптомными различиями, влияющими на повышенный синтез ацетатов, бактериоцинов, веществ с антиоксидантной активностью и других полезных метаболитов. В то же время пока не все механизмы действия *S. boulardii* раскрыты и требуют дальнейшего более подробного изучения.

Для некоторых других сахаромисетов пока установлены отдельные **пробиотические** эффекты *in vitro* (резистентность к условиям желудочно-кишечного тракта, антагонистическая активность, антиоксидантные свойства и др.). Необходимо подтвердить безопасность этих микроорганизмов и их полезное действие в доклинических и контролируемых клинических исследованиях. В целом сахаромисеты могут иметь преимущества по сравнению с пробиотиками бактериального происхождения: они невосприимчивы к действию антибиотиков, могут выполнять роль транзиторных пробиотиков, которые оказывают благоприятное воздействие на нормальную микробиоту кишечника и его эпителий, а затем быстро выводятся из организма.

Основой пробиотической активности *S. boulardii* и других сахаромисетов является комплекс метаболитов, включающий органические кислоты, спирты, эфиры, витамины, антиоксиданты, аминокислоты, ферменты и др. вещества, которые считаются **метабиотиками**. Некоторые из них, в том числе микоцины, определяют антагонистическую активность дрожжей по отношению к патогенным бактериям, грибам, вирусам и простейшим, и могут способствовать решению проблемы антибиотикорезистентности. Более того, метаболиты и компоненты клеток пробиотиков даже в отсутствие живых микроорганизмов могут приносить пользу для здоровья, и рассматриваются как **постбиотики**. Например, супернатант пробиотического штамма *K. marxianus* улучшил сенсбилизацию к инсулину, показал антиадипогенную способность и антиоксидантную активность, а также цитотоксическое действие на клетки колоноRECTАЛЬНОГО РАКА [48].

Сахаромисеты могут стимулировать рост и способствовать повышению выживаемости молочнокислых бактерий, в том числе пробиотиков, как в кисломолочных напитках, так и в кишечнике. Совместное использование с пребиотиками дает возможность получать продукты-**синбиотики** с улучшенной усвояемостью. Добавление пробиотических сахаромисетов в ферментированные продукты из растительного и молочного сырья может не только улучшить их функциональные свойства, но и повысить качество и безопасность. Продолжение исследований в этой области рас-

ширит представления о пробиотиках и возможностях их применения в фармацевтической и пищевой биотехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nielsen J.* // *Biotechnol J.* 2019. V. 14. № 3. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
2. *Hatoum R., Labrie S., Fliss I.* // *Front Microbiol.* 2012. V. 19. № 3. doi.org/10.3389/fmicb
3. *Staniszewski A., Kordowska-Wiater M.* // *Foods.* 2021. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
4. *Vemuri R., Shankar E.M., Chieppa M., Eri R., Kavanagh K.* // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040483>
5. *Nash A.K., Auchtung T.A., Wong M.C., Smith D.P., Gessell J.R., Ross M.C., et al.* // *Microbiome.* 2017. V. 5. № 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
6. *Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R. et al.* // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2014. V. 11. P. 506–514.
7. *Рябцева С.А., Сазанова С.Н., Дубинина А.А.* // *Современная наука и инновации.* 2019. № 2(26). С. 138–151.
8. *Pais P., Almeida V., Yilmaz M., Teixeira M.C.* // *J Fungi (Basel).* 2020. V. 6. № 2. P. 78. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>
9. *Lazo-Vélez M.A., Serna-Saldívar S.O., Rosales-Medina M.F., Tinoco-Alvear M., Briones-García M.* // *A review. J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 125. P. 943–951.
10. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016 // *EFSA Journal.* 2017. V. 15. P. 4366. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4663>
11. *McFarland L.V.* // *World J Gastroenterol.* 2010. V. 16. № 18. P. 2202–2222. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202>
12. *McFarland L., Bernasconi P.* // *Microbial Ecology in Health and Disease.* 1993. V. 6. P. 157–171.
13. *McCullough M.J., Clemons K.V., McCusker J.H., Stevens D.A.* // *J. Clin. Microbiol.* 1998. V. 36. P. 2613–2617. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2613-2617.1998>
14. *Czerucka D., Piche T., Rampal P.* // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007. V. 26. P. 767–778.
15. *McFarland L.V.* // *A Meta-analysis and Systematic Review. Antibiotics (Basel).* 2015. V. 13. P. 160–78.
16. *Szajewska H., Horvath A., Kołodziej M.* // *Aliment Pharmacol Ther.* 2015. V. 41. № 12. P. 1237–45.
17. *Szajewska H., Kołodziej M.* // *Aliment Pharmacol Ther.* 2015. V. 42. № 7. P. 793–801.
18. *Moré M.I., Vandenplas Y.* // *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2018. V. 11. <https://doi.org/10.1177/1179552217752679>
19. *Kaźmierczak-Siedlecka K., Ruszkowski J., Fic M., Fohwarski M., Makarewicz W.* // *Curr. Microbiol.* 2020.

- V. 77. № 9. P. 1987–1996.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02053-9>
20. Li Z., Zhu G., Li C., Lai H., Liu X., Zhang L. // *Nutrients*. 2021. V. 13. № 12. P. 4319.
<https://doi.org/10.3390/nu13124319>
 21. Кайбышева В.О., Никонов Е.Л. Пробиотики с позиции доказательной медицины // *Доказательная гастроэнтерология*. 2019. № 8(3). С. 45–54. doi.org/
<https://doi.org/10.17116/dokgastro2019803145>
 22. Mitterdorfer G., Mayer H.K., Kneifel W., Viernstein H. // *J. Appl. Microbiol.* 2002. V. 93. P. 521–530.
 23. Fietto J.L., Araújo R.S., Valadão F.N., Fietto L.G., Brandão R.L., Neves M.J. et al. // *Can. J. Microbiol.* 2004. V. 50. P. 615–621.
 24. Edwards-Ingram L., Gitsham P., Burton N., Warhurst G., Clarke I., Hoyle D. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 2458–2467.
 25. Liu Y., Wu Q., Wu X., Algharib S. A., Gong F., Hu J. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 173. P. 445–456.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.125>
 26. Fortin O., Aguilar-Uscanga B., Vu K.D., Salmieri S., Lacroix M. // *Nutr. Cancer*. 2018. V. 70. № 1. P. 83–96.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1380204>
 27. Rajkowska K., Kunicka-Styczyńska A. // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2009. V. 23. P. 662–665.
 28. Fernández-Pacheco P., Pintado C., Briones Pérez A., Arévalo-Villena M. J. // *Fungi (Basel)*. 2021. V. 7. № 3. P. 177.
<https://doi.org/10.3390/jof7030177>
 29. Datta S., Timson D.J., Annappure U.S. // *J Sci Food Agric*. 2017. V. 97. № 9. P. 3039–3049.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8147>
 30. Offei B., Vandecruys P., De Graeve S., Foulquié-Moreno M.R., Thevelein J.M. // *Genome Res*. 2019. V. 9. P. 1478–1494.
<https://doi.org/10.1101/gr.243147.118>
 31. Khatri I., Tomar R., Ganesan K., Prasad G.S., Subramanian S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 371–385.
 32. Pais P., Oliveira J., Almeida V., Yilmaz M., Monteiro P.T., Teixeira M.C. // *Genomics*. 2021. V. 113. P. 530–539.
 33. Fernández-Pacheco P., Arévalo-Villena M., Rosa I.Z., Briones Pérez A. // *Food Res. Int.* 2018. V. 112. P. 143–151.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.008>
 34. Fernández-Pacheco P., Arévalo-Villena M., Bevilacqua A., Corbo M.R., Briones A. // *LWT Food Sci Technol.* 2018. V. 97. P. 332–340.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018>
 35. Fernández-Pacheco P., Ramos Monge I.M., Fernández-González M., Poveda Colado J.M., Arévalo-Villena M. // *Front. Nutr.* 2021. V. 8.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.659328>
 36. Fernández-Pacheco P., García-Béjar B., Jiménez-Del Castillo M., Carreño-Domínguez J., Briones Pérez A., Arévalo-Villena M.J. // *Sci. Food Agric*. 2021. V. 101. № 6. P. 2201–2209.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10839>
 37. Fernández-Pacheco P., Rosa I.Z., Arévalo-Villena M., Gomes E., Pérez A.B. // *Braz. J. Microbiol.* 2021. V. 52. № 4. P. 2129–2144.
<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00541-z>
 38. Simões L.A., Cristina de Souza A., Ferreira I., Melo D.S., Lopes L.A.A., Magnani M. et al. // *J. Appl. Microbiol.* 2021. V. 131. № 4. P. 1983–1997.
<https://doi.org/10.1111/jam.15065>
 39. Reyes-Becerril M., Alamillo E., Angulo C. // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021. V. 13. № 5. P. 1292–1305.
<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09769-5>
 40. Palla M., Blandino M., Grassi A., Giordano D., Sgherri C., Quartacci M.F. et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 12856.
 41. Palla M., Conte G., Grassi A., Esin S., Serra A., Mele M. et al. // *Foods*. 2021. V. 10. № 9. P. 2087.
 42. Okada Y., Tsuzuki Y., Sugihara N., Nishii S., Shibuya N., Mizoguchi A. et al. // *J. Gastroenterol.* 2021. V. 56. № 9. P. 829–842.
<https://doi.org/10.1007/s00535-021-01804-0>
 43. Chelliah R., Kim E.J., Daliri E.B., Antony U., Oh D.H. // *Foods*. 2021. V. 10. № 6. P. 1428.
<https://doi.org/10.3390/foods10061428>
 44. Pereira R.P., Jadhav R., Baghela A., Barretto D.A. // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021. V. 13. № 3. P. 796–808.
<https://doi.org/10.1007/s12602-020-09734-8>
 45. Zahoor F., Sooklim C., Songdech P., Duangpakdee O., Soontornngun N.S. // *Metabolites*. 2021. V. 11. № 5. P. 312.
<https://doi.org/10.3390/metabo11050312>
 46. Li S., Zhang Y., Yin P., Zhang K., Liu Y., Gao Y. et al. // *J Dairy Sci*. 2021. V. 104. № 6. P. 6559–6576.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19845>
 47. Hsiung R.T., Fang W.T., LePage B.A., Hsu S.A., Hsu C.H., Chou J.Y. // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021. V. 13. № 1. P. 113–124.
<https://doi.org/10.1007/s12602-020-09661-8>
 48. Nag D., Goel A., Padwad Y., Singh D. // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2022. V. 18.
<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09874-5>
 49. Youn H.Y., Kim D.H., Kim H.J., Jang Y.S., Song K.Y., Bae D. et al // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2022.
<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09872-7>
 50. Parafati L., Palmeri R., Pitino I., Restuccia C. // *Food Microbiol.* 2022. V. 103. P. 103950.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103950>
 51. Czerucka D., Rampal P. // *World J. Gastroenterol.* 2019. V. 25. № 18. P. 2188–2203.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i18.2188>
 52. Наумова Е.С., Садыкова А.Ж., Михайлова Ю.В., Наумов Г.И. Полиморфизм лактозных генов молочных дрожжей *Kluuyveromyces marxianus*, потенциальных пробиотических микроорганизмов. // *Микробиология*. 2017. Т. 86. № 3. С. 335–343.
 53. Голубев В.И. Микоцинотирование // *Микология и фитопатология*. 2012. Т. 46. № 1. С. 3–13.
 54. Nascimento B.L., Delabeneta M.F., Rosseto L.R.B., Junges D.S.B., Paris A.P., Persel C. et al. // *FEMS Yeast Research*. 2020. V. 20. № 3.
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa016>
 55. Roussel C., De Paepe K., Galia W., de Bodt J., Chalancon S., Denis S. et al. // *Gut Microbes*. 2021. V. 13. № 1.

- P. 1953246.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1953246>
56. Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. // Saudi J. Biol. Sci. 2022. V. 29. № 1. P. 550–563.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.025>
57. Ansari F., Alian Samakkhah S., Bahadori A., Jafari S.M., Ziaee M., Khodayari M.T. et al. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2021. V. 13. P. 1–29.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1949577>
58. Swieca M., Kordowska-Wiater M., Pytka M., Gawlik-Dziki U., Seczyk L., Złotek U. et al. // LWT. 2019. V. 100. P. 220–226.
59. Chan M.Z.A., Toh M., Liu S.Q. // Int. J. Food Microbiol. 2021. V. 4. P. 350–109229.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109229>
60. Polanowska K., Varghese R., Kuligowski M., Majcher M. // J. Sci. Food Agric. 2021. V. 101. № 13. P. 5487–5497.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.11197>
61. Senkarcinova B., Graça Dias I.A., Nespore J., Branyik T. // LWT. 2019. V. 100. P. 362–367.
62. Sarwar A., Tariq A., Al-Dalali S., Zhao X., Zhang J., Jalal ud Din et al. // Foods. 2019. V. 8. P. 468.
63. Andrade R.P., Oliveira D.R., Alencar Lopes A.C., Abreu L.R., Duarte W.F. // Food Research International. 2019. V. 125. № 2019
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108620>
64. Poloni V.L., Bainotti M.B., Vergara L.D., Escobar F., Montenegro M., Cavaglieri L. // Curr. Res. Food Sci. 2021. V. 4. P. 132–140.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.02.006>

Probiotic Properties of Saccharomycetes (Review)

S. A. Ryabtseva^{a, *}, A. G. Khrantsov^a, S. N. Sazanova^a, R. O. Budkevich^a,
 N. M. Fedortsov^a, and A. A. Veziryan^a

^a North-Caucasus Federal University, Stavropol, 355017 Russia

*e-mail: ryabtseva07@mail.ru

The purpose of the review is to summarize and analyze information on the molecular genetic basis and methods for studying the probiotic activity of *Saccharomycetes* fungi, the mechanisms of their physiological action, and their application in biotechnology. The relevance of research in this area is confirmed by the dynamics of the growth of publications. The effectiveness of *Saccharomyces boulardii* in the treatment and prevention of diarrhea of various etiologies, relapses of *C. difficile* infection, side effects of *H. pylori* infection therapy has been established with a high level of evidence. Genetic, cytological, cultural and biochemical features of *S. boulardii* determine their probiotic activity. Other *Saccharomyces* strains with probiotic potential are most often isolated from national fermented plant and dairy products. A unified methodology for studying the probiotic properties of yeast has not yet been created; clinical trials involving people are needed to confirm their status. Promising probiotics are strains of the species *S. cerevisiae* and *K. marxianus*, which have an international safety status. Possible mechanisms of physiological action of *Saccharomycetes* include antimicrobial and antitoxic, trophic, antisecretory and anti-inflammatory effects. Some of the mechanisms of yeast probiotic action differ from those of bacteria, and not all of them are yet understood. *Saccharomycetes* probiotics can be used to improve the biological value, quality and safety of food products.

Keywords: *Saccharomycetes*, *Saccharomyces boulardii*, probiotics, research methods, mechanisms of action, application

УДК 579.26;579.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В БИОРЕМЕДИАЦИИ ОТ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛОИДОВ (ОБЗОР)

© 2023 г. А. Л. Брюханов¹, Т. В. Хижняк², *

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tanya_khijniak@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принята к публикации 10.09.2022 г.

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, металлоидами и радионуклидами представляет собой проблему мирового значения, в значительной степени влияющую на состояние биосферы. В частности, соединения хрома обладают токсичным, мутагенным и канцерогенным действием. Основной принцип очистки антропогенных и природных экосистем от хроматов – восстановление Cr(VI) до Cr(III), соли которого существенно менее токсичные и нерастворимые. Однако используемые в настоящее время электрохимические и ионообменные методы очистки достаточно дороги и требуют применения специальных реагентов. В то же время, особый интерес для биоремедиации представляют сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), поскольку многие из них весьма устойчивы к высоким концентрациям тяжелых металлов и способны эффективно восстанавливать их в присутствии водорода как донора электронов. В обзоре суммированы сведения о взаимодействии тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов с клетками СРБ. Рассматриваются особенности метаболизма этих микроорганизмов, приводящие к внутриклеточной аккумуляции тяжелых металлов и металлоидов, сложные и тонко регулируемые ферментативные механизмы восстановления токсичных металлов (с использованием различных цитохромов, гидрогеназ, оксидоредуктаз, узкоспецифичных металлоредуктаз и тиоредоксин/тиоредоксинредуктазных систем), а также возможность применения иммобилизованных клеток и биопленок СРБ в эффективной биоремедиации природных вод, почв и промышленных стоков.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), биоремедиация, тяжелые металлы, металлоиды, радионуклиды, металлоредуктазы

DOI: 10.31857/S0555109923020034, **EDN:** LKVILK

Загрязнение окружающей среды токсичными тяжелыми металлами, металлоидами и радионуклидами представляет собой проблему мирового значения, серьезно влияющую как на здоровье людей, так и на состояние биосферы в целом. Используемые в настоящее время традиционные физико-химические методы очистки шахтных и производственных сточных вод, а также почв, достаточно дороги, не всегда высокоэффективны и требуют применения специальных химических реагентов. В то же время, целый ряд микроорганизмов обладает способностью восстанавливать и удалять из растворов тяжелые металлы и металлоиды, поскольку их восстановленные формы часто менее растворимы и менее токсичны, чем окисленные [1]. Особый интерес для технологий биоремедиации подобного рода представляют сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), поскольку

многие СРБ не нуждаются в сложных питательных средах, устойчивы к высоким концентрациям токсичных солей и способны эффективно восстанавливать тяжелые металлы как химически, образуя H₂S и элиминируя металлы путем осаждения их сульфидов, так и ферментативно, в частности, с помощью гидрогеназ и цитохромов c-типа в присутствии водорода как донора электронов [2–4].

Сульфатредуцирующие бактерии представляют собой филогенетически неоднородную группу анаэробных микроорганизмов, объединенных общей физиологической чертой – способностью к диссимиляционному восстановлению сульфатов до сульфидов. В качестве донора электронов СРБ способны использовать более сотни органических субстратов, преимущественно, низкомолекулярных, а также молекулярный водород.

Лактат и пропионат являются типичными субстратами для неполного окисления до ацетата из-за незамкнутого ЦТК, который в основном осуществляют представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfobulbus*. Субстратами для СРБ, способными к полному окислению до CO_2 , часто являются жирные кислоты. В качестве терминального акцептора электронов может выступать целый ряд органических и неорганических соединений, но в основном, сульфаты, тиосульфаты и сульфиты [5]. Таким образом, СРБ играют очень важную роль в глобальных биогеохимических циклах серы и углерода.

СРБ могут существовать в самых разнообразных условиях окружающей среды и широко распространены в природе: их обнаруживают, например, в морских донных отложениях [6, 7], микробных матах [8] и в толще морских вод [9]. В большом количестве присутствуют они и в биопленках, в том числе и в анаэробных зонах водоочистных сооружений [10]. СРБ были найдены также в местообитаниях с экстремальными значениями pH (кислые шахтные воды с pH 2.0 [11] и содовые озера с pH 10.5 [12]) и температуры (гидротермы [13]). Долгое время считалось, что сульфатредукторы, будучи строгими анаэробами, способны существовать исключительно в бескислородных местообитаниях, однако современные исследования указывают на высокую аэротолерантность многих видов СРБ, обладающих эффективными ферментативными механизмами защиты клеток от окислительных стрессов [14].

В соответствии с результатами сравнительного анализа генов 16S рРНК описанные к настоящему времени сульфатредуцирующие микроорганизмы делятся на семь филогенетических групп, пять из которых входят в домен *Bacteria*, а две — в домен *Archaea* [5]. Основная часть представителей СРБ относится к типу *Proteobacteria*, а именно к классу δ -*Proteobacteria*, а также к типу *Firmicutes*, классу *Clostridia*. Класс δ -*Proteobacteria* включает в себя грамотрицательные преимущественно мезофильные формы, а класс *Clostridia* — грамположительные спорообразующие формы. Три семейства из типа *Nitrospirae* содержат исключительно термофильные СРБ (роды *Thermodesulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* и *Thermodesulfobium*). В домене *Archaea* сульфатредукторы обнаружены в двух типах — *Crenarchaeota* (роды *Thermocodium* и *Calditerrivirga*) и *Euryarchaeota* (род *Archaeoglobus*).

За последнее время накоплен достаточно большой массив данных как по процессам химического и ферментативного восстановления токсичных металлов, металлоидов и радионуклидов, так и по оптимальным параметрам, требующимся для биоремедиации почв и сточных вод в различных физико-химических условиях при помощи СРБ. Кроме того, использование молекулярно-генети-

ческих методов позволило обнаружить в клетках СРБ принципиально новую металл-редуктазную систему с участием тиоредоксина [15], представляющую интерес для изучения в качестве потенциальной основы для разработки биокатализаторов и высокоэффективных ферментативных систем очистки от тяжелых металлов. В настоящем обзоре мы постарались осветить ключевые вопросы и перспективы биоремедиации экосистем от тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов с применением сульфатредуцирующих микроорганизмов.

ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ И МЕТАЛЛОИДАМИ

Согласно ГОСТ Р 17.4.3.07–2001: “Тяжелые металлы — группа металлов с атомной массой более 50 (Pb, Cd, Ni, Cr, Zn, Cu, Hg), которые при определенных концентрациях могут оказывать токсичное действие”. Также в обзоре будут рассмотрены металлоиды (мышьяк, селен) и радионуклиды (технеций, уран), тоже представляющие опасность для окружающей среды и поддающиеся утилизации методами биоремедиации аналогично тяжелым металлам.

В результате значительного использования тяжелых металлов в различных отраслях промышленности загрязненность ими окружающей среды значительно возросла [16]. Несмотря на присутствие тяжелых металлов в земной коре, основным источником загрязнения служит именно антропогенная деятельность: горнодобывающая и литейная промышленности, а также производство пластмассы, текстиля, бумаги и т.д. [17, 18]. Годовой выброс в биосферу тяжелых металлов и металлоидов огромен и достигает, в частности, для мышьяка 120 тыс. т, для селена 79 и 30 тыс. т для кадмия [19]. Природные явления, такие как выветривание и извержения вулканов, также вносят определенный вклад в загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами и металлоидами [20]. Многократно возросшая циркуляция токсичных солей металлов и металлоидов в почве, воде и воздухе, влекущая за собой их неизбежное попадание в пищевые цепи и, следовательно, в продукты питания человека, является серьезной проблемой, скрывающей в себе, в том числе, риски для здоровья будущих поколений и нормального функционирования экосистем.

Некоторые тяжелые металлы являются незаменимыми элементами, необходимыми для протекания различных биохимических и физиологических реакций в организме; часто они входят в состав ключевых ферментов. Однако необходимые для живых организмов в малых дозах, в избыточном количестве эти микроэлементы оказывают повре-

ждающие воздействия на ткани и органы, приводя к возникновению ряда тяжелых заболеваний [21].

Хром (Cr) представляет собой твердый металл стального цвета (относят к черным металлам). В водные экосистемы хром попадает в природе при выветривании горных пород, с пылью из атмосферы, с дождевыми стоками. Концентрация хрома в реках и озерах обыкновенно не превышает 0.5 нМ [22], тогда как в морях его уровень составляет 0.1–16 нМ [23]. Хром имеет несколько степеней окисления, варьирующих от Cr²⁺ до Cr⁶⁺, наиболее стабильны Cr³⁺ и Cr⁶⁺. Хром(III) является микроэлементом, необходимым большинству живых организмов, он проникает в клетки благодаря транспортной системе сульфат/фосфат-анионов [24]. При этом даже небольшое повышение уровня Cr(VI) в почвах и сточных водах вызывает экологические проблемы и угрожает здоровью людей по причине его высокой токсичности и канцерогенности, приводящим к повреждениям ДНК и сшиваниям молекул ДНК-белок [24–26]. Хром широко используется в различных производственных областях (металлургия, гальванизация, производство бумаги, красок, выделка кож), а его концентрация в промышленных стоках часто достигает 2000–5000 мг/л при рекомендованной норме в 2 мг/л [27].

Токсичное действие Cr(VI) обусловлено как его собственной окислительной активностью, так и формированием свободных радикалов в реакции восстановления Cr(VI) → Cr(III). Соли Cr(VI), как правило, хорошо растворимы в воде и более биодоступны по сравнению с плохо растворимыми солями трехвалентного хрома. Содержание и тип ионов хрома в сточных водах зависит от характера производственного процесса, pH, концентрации органического вещества [28]. При нейтральном или слабощелочном pH в стоках преобладает малорастворимый Cr(OH)₃, однако высокое содержание органического вещества может привести к образованию растворимых металлоорганических комплексов Cr(III), ингибирующих многие ферменты [29].

Кадмий (Cd) – металл, близкий по свойствам к цинку; обычно существует в форме двухвалентного катиона (например, CdCl₂) [30]. В земной коре кадмий входит, в основном, в состав цинковых или свинцовых руд, плавление которых является основным источником попадания кадмия в окружающую среду [31]. В промышленности Cd применяется при производстве телевизионных экранов, лазеров, аккумуляторных батарей, пигментов, а также для гальванизации сталей [30]. ПДК кадмия в питьевой воде согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 составляет 1 мкг/л.

Ткани организма человека адсорбируют 10–50% вдыхаемого с парами кадмия и 5–10% попавшего с пищей; при этом повышенная адсорбция кад-

мия отмечается в ЖКТ людей с недостаточностью по железу, кальцию или цинку [32].

В Китае многие рисовые поля, орошаемые сточными водами, теряют урожайность именно из-за высоких концентраций кадмия, 45–60% которого в загрязненных почвах содержится в обменной фракции, 35–55% приходится на фракцию оксидов Fe–Mn, а незначительная часть присутствует в карбонатной и органической фракциях [33]. Токсическое действие кадмия проявляется в виде эпигенетических изменений в ДНК и повреждении белков (за счет связывания сульфгидрильных, карбоксильных и аминных групп). Растворимые соединения кадмия поражают ЦНС, печень и почки, нарушают фосфо-кальциевый обмен; хроническое отравление приводит к анемии и повреждению костной ткани [30].

Мышьяк (As) является металлоидом и присутствует в природе в четырех различных состояниях – As⁵⁺, As³⁺, As⁰ и As³⁻. Мышьяк находится в окружающей среде преимущественно в составе сульфидных минералов: реальгар (AsS), аурипигмент (As₂S₃), арсенопирит (FeAsS) [34]. В морской воде концентрация мышьяка колеблется в пределах 0.09–24.0 мкг/л, в пресной – 0.15–0.45 мкг/л [34]. В минеральных водах концентрация мышьяка может в 300 и более раз превышать среднее значение для грунтовых вод. В водных экосистемах мышьяк находится в виде мышьяковой или ортомышьяковистой кислот и их солей. Неорганические соединения мышьяка подвергаются метилированию бактериями и грибами с образованием метиларсоновой и диметиларсиновой кислот, а также газообразного арсина [35].

Основным антропогенным источником загрязнения мышьяком грунтовых вод и почв является плавка медных, никелевых, свинцовых и цинковых руд. Годовой выброс мышьяка в окружающую среду достигает 62000 т, причем 80% приходится на долю медеплавильных комбинатов [35, 36]. Содержание мышьяка в шахтных водах стран Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки колеблется в пределах 5–72 мг/л. Другим антропогенным источником мышьяка является сжигание ископаемого топлива в домашних хозяйствах и на электростанциях [34, 36]. Важным источником антропогенного загрязнения мышьяком было использование фунгицидов, гербицидов и инсектицидов на его основе. В таких сельскохозяйственных почвах содержание мышьяка может достигать 2 г/кг [37].

Накопление мышьяка приводит к многочисленным нарушениям в организме человека. Была показана тесная связь между отравлением мышьяком и повышенным риском возникновения онкологических заболеваний и системных физиологических нарушений [38]. Мышьяк поражает сердечно-сосудистую и дыхательную системы,

Таблица 1. Ключевые белки, участвующие в восстановлении металлов и металлоидов клетками СРБ

Белок	Пример микроорганизма	Металл, металлоид
Цитохром c_3 (периплазматический)	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Хром (Cr), уран (U)
Цитохром c -типа (мембранный)	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	Мышьяк (As)
[Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Хром (Cr)
[Ni–Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	Хром (Cr), технеций (Tc)
[Ni–Fe–Se]-гидрогеназа	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	Хром (Cr)
Ферредоксин II	<i>Desulfovibrio gigas</i>	Хром (Cr)
ArsC-подобный белок (цитоплазматический)	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Мышьяк (As)
Металл-редуктаза MreG	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Хром (Cr), уран (U)

кожные покровы, почки и ЖКТ [39, 40]. Токсичность арсенита в 2–10 раз превышает таковую арсената, а органические соединения мышьяка менее токсичны, чем неорганические [39]. Связываясь с тиоловыми или сульфгидрильными группами, арсенит ингибирует более 200 ферментов, а арсенат, в свою очередь, может замещать фосфат. Соединения мышьяка способны также ингибировать репарацию ДНК и вызывать хромосомные аберрации [41].

Селен (Se) – металлоид черного цвета, широко распространенный в природе. Преимущественный вклад в его распространение вносят вулканическая активность, сжигание ископаемого топлива, выветривание скал и почв, перенос грунтовыми водами, осаждение минералов, химическое или бактериальное осаждение, метаболизм человека и растений. Селен может находиться в окружающей среде в форме Se^{2-} , Se^0 , SeO_3^{2-} и SeO_4^{2-} . Селениды металлов, сульфиды селена и элементный селен – нерастворимы и поэтому биологически недоступны [42]. В большинстве почв и природных вод преобладают селениты и селенаты: селениты адсорбируются на твердых частицах, преимущественно на оксигидроксидах железа; селенаты, напротив, обладают высокой подвижностью и биологической активностью, адсорбируются плохо. В антропогенных экосистемах селен присутствует, в основном, в сельскохозяйственных дренажных стоках, шахтных водах с низким pH и газообразных продуктах сероочистки [42].

В зависимости от концентрации, селен является как полезным микроэлементом для людей и некоторых животных и растений, так и токсичным. Отравление селеном у животных наступает при его ежедневном употреблении с пищей в концентрации более 4 мг/кг веса [43].

Уран (U) – природный актиноид, радиоактивный металл, в малых количествах встречающийся во всех горных породах, почвах и водах; он занимает 51 место по встречаемости среди химических элементов земной коры. Средняя концентрация

урана в земной коре составляет 2–4 мг/кг [44]. Уран входит в состав сотен минералов, включая наиболее часто встречающийся уранинит, карнонит, торбернит и другие, наиболее стабильны валентные состояния U(VI) и U(IV). Мировая продукция урана в 2010 г. достигала 54000 т, из которых 17803 т (33%) вырабатывалось в Казахстане. Отравление ураном приводит к нарушению функции почек, мозга, печени, сердца и других органов, поскольку, наряду со слабой радиоактивностью, он является достаточно токсичным металлом [44], серьезно воздействуя, в том числе, и на репродуктивные функции [45].

Технеций является продуктом распада урана ^{235}U , это радиоактивный переходный металл серебристо-серого цвета. Наиболее распространенный радиоактивный изотоп ^{99}Tc имеет период полураспада 2.1×10^5 лет. Технеций входит в состав промышленных вод, образующихся в результате переработки ядерного топлива [46]. Наиболее стабилен ион пертехнетата TcO_4^- , обладающий чрезвычайной подвижностью в окружающей среде. Пертехнетаты способны включаться в пищевые цепи и активно ассимилируются растениями с помощью системы транспорта сульфата [47], поэтому очистка сточных вод от содержащегося в них технеция крайне необходима. Вследствие низкой растворимости восстановленного технеция, в частности, оксидов Tc(IV) и Tc(V), микробное восстановление пертехнетатов было предложено в качестве основы для биотехнологической очистки ряда стоков атомной промышленности [1, 46].

Как уже упоминалось выше, наряду с химическим осаждением тяжелых металлов путем образования их нерастворимых сульфидов, СРБ обладают рядом белков, обладающих металл-редуктазной активностью (табл. 1). Ниже мы подробнее остановимся на механизмах восстановления различных тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов клетками СРБ.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ ХРОМА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Ферментативные механизмы восстановления Cr(VI). Способность целого ряда микроорганизмов восстанавливать высокотоксичные и хорошо растворимые в воде соли Cr(VI) до менее токсичных и слабо растворимых солей Cr(III) давно обратила на себя внимание исследователей [1, 48]. Долгое время наиболее изученным микроорганизмом в этой области оставался *Enterobacter cloacae* [49]. Однако удаление Cr(VI) из промышленных стоков с помощью этой бактерии представлялось затруднительным, так как сульфаты и тяжелые металлы ингибировали процесс восстановления хрома клетками *E. cloacae* [50]. Открытие того факта, что некоторые представители СРБ рода *Desulfovibrio* способны к восстановлению Fe(III) и U(VI) не только химически, за счет образуемого H₂S, но и ферментативно [51, 52], навело исследователей на мысль и о возможной хроматредуктазной активности в клетках этих бактерий. Действительно, такая активность была вскоре обнаружена [53]: клетки *Desulfovibrio vulgaris* демонстрировали H₂-зависимое восстановление Cr(VI) до Cr(III). Восстановление Cr(VI) также происходило в присутствии очищенных гидрогеназ и полигемовых цитохромов *c₃* *D. vulgaris* при внесении в раствор H₂.

В отличие от *E. cloacae*, восстановление Cr(VI) до Cr(III) клетками *D. vulgaris* не ингибировалось сульфатом даже при его высоких концентрациях (50 мМ). Также клетки демонстрировали сохранение хроматредуктазной активности при добавлении в питательную среду до 100 мкМ NiCl₂, MnSO₄, CoCl₂, CuCl₂ и ряда других токсичных металлов [53]. Позже было показано, что способность к ферментативному восстановлению хромата широко распространена среди различных СРБ, в частности, у *Desulfomicrobium norvegicum*, *Desulfomicrobium escambiense*, *D. vulgaris* Hildenborough, *Desulfovibrio gigas* и *Desulfovibrio desulfuricans* [2]. Таким образом, СРБ являются весьма перспективными микроорганизмами для биоремедиации анаэробных сточных и промышленных вод, а также морских осадков, загрязненных хроматами.

Были изучены эффекты, оказываемые высокими концентрациями хрома на клетки *D. norvegicum* DSM 1741: бактерии были способны к делению при концентрации хромата в питательной среде до 500 мкМ. При более высоком содержании хрома морфология клеток изменялась с палочковидной на филаментную. Восстановление Cr(VI) в отсутствие сульфата не было связано с ростом. В присутствии хромата наблюдали выход периплазматических белков и цитохромов типа *c* в окружающую среду, что свидетельствовало о нарушении целостности внешней мембраны кле-

ток [2]. Изучение взаимодействия между Cr(VI) и полигемовыми цитохромами на молекулярном уровне с помощью ЯМР показало наличие в структуре цитохромов специфических сайтов связывания атомов хрома [54].

Был проведен сравнительный анализ хроматредуктазной активности полигемовых цитохромов *c*, выделенных из различных видов сульфат- и сероредуцирующих бактерий [2]. Показано, что активность тетрагемового цитохрома *c₃* из *D. norvegicum* вдвое превышает такую тетрагемового цитохрома *c₃* из *D. vulgaris* Hildenborough или тригемового цитохрома *c₇* из *Desulfuromonas acetoxidans* (табл. 2). Однако цитохром *c₅₅₃* *D. vulgaris* Hildenborough не проявлял хроматредуктазной активности, что свидетельствует о критической важности гемов с отрицательным редокс-потенциалом для ферментативного восстановления металлов. Сайт-направленный мутагенез в отношении цитохромов типа *c* подтвердил это предположение [2].

Было показано, что в дополнение к полигемовым цитохромам типа *c* с низким редокс-потенциалом, способностью к восстановлению хроматов обладают периплазматические [Fe]-, [Ni-Fe]- и [Ni-Fe-Se]-гидрогеназы, выделенные у представителей родов *Desulfovibrio* и *Desulfomicrobium*. Причем хроматредуктазная активность [Fe]-гидрогеназы из *D. vulgaris* Hildenborough оказалась наиболее высокой (табл. 2) [2]. Константа Михаэлиса по отношению к Cr(VI) была одинаковой для [Fe]- и [Ni-Fe-Se]-гидрогеназ, что свидетельствует о прямой корреляции скорости восстановления Cr(VI) до парамагнитного Cr(III) со скоростью поглощения водорода. Эксперименты с [3Fe-4S]-ферредоксином II из *D. gigas* показали, что в процессе восстановления металлов гидрогеназами участвуют негемовые [Fe-S]-кластеры с низким редокс-потенциалом [55]. Была предложена схема переноса электронов между активными центрами [Ni-Fe]-гидрогеназы при восстановлении хроматов (рис. 1).

Таким образом, за восстановление Cr(VI) *in vivo* клетками СРБ отвечают сразу несколько ферментов, имеющих низкий редокс-потенциал. Это хорошо проиллюстрировал эксперимент с мутантным штаммом *D. vulgaris* Hildenborough Hyd 100, несущим делецию в опероне [Fe]-гидрогеназы: такие клетки не потеряли способность восстанавливать Cr(VI), хотя и осуществляли это с существенно меньшей скоростью [55].

Энзиматическое восстановление Cr(VI) покоящимися клетками *D. vulgaris*, использующими молекулярный водород, требует наличия в буферном растворе комплексобразующих лигандов или хелатирующих агентов, например, таких как, нитрилтриуксусная кислота, ЭДТА, ДТПА (диэтилентриаминпентауксусная кислота), пентетовая кислота, цитрат или гидрокарбонат натрия. Стиму-

Таблица 2. Скорость восстановления хрома и мышьяка различными ферментами, выделенными и очищенными из клеток СРБ [по 2, 55, 56]

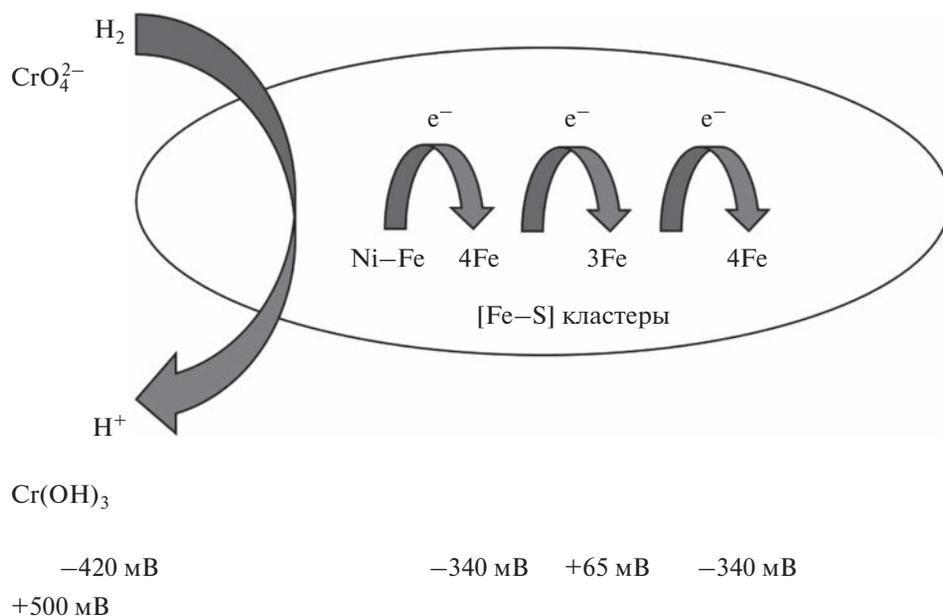
Фермент	Микроорганизм	Скорость восстановления, мкмоль/мин на мг белка
Цитохром c_3	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	391 (Cr)
Цитохром c_3	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	739 (Cr)
Цитохром c_7	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	557 (Cr)
Цитохром c_3 H35M	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	400 (Cr)
Цитохром c_3 H22M	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	341 (Cr)
[Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	7679 (Cr)
[Ni-Fe-Se]-гидрогеназа	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	161 (Cr)
[Ni-Fe]-гидрогеназа	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	80 (Cr)
Арсенатредуктаза (мембранная)	<i>Desulfomicrobium</i> sp.	98 (As)
Арсенатредуктаза (цитоплазматическая)	<i>Desulfovibrio</i> sp.	1.6 (As)

лирующий эффект этих лигандов на скорость восстановления Cr(VI) коррелирует с силой связывания иона металла лигандным/хелатирующим комплексом Cr(III). Максимальную скорость восстановления Cr(VI) наблюдали при использовании ДТПА и цитрата натрия – до 26.36–29.13 нмоль/ч на мг сухой биомассы [57]. Применение нитрилтриуксусной кислоты или ЭДТА в масштабных биоремедиационных процессах представляется экономически неоправданным, в то время как бикарбонат, цитрат и формиат в достаточном количестве присутствуют во многих анаэробных экосистемах; в частности, формиат может выступать как донор электронов

для биологического восстановления Cr(VI), а также формировать комплекс с Cr(VI) в растворах [57].

Токсическое воздействие Cr(VI) на клетки СРБ.

Для оценки эффекта тяжелых металлов на биоэнергетический метаболизм клеток с целью выявления наиболее устойчивых к хроматам штаммов СРБ, пригодных для использования в биоремедиационных процессах, был предложен метод изотермальной микрокалориметрии. Эксперименты проводили на *Desulfomicrobium norvegicum* и *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [58]. Было показано, что в присутствии высоких (125–250 мкМ) concentra-

**Рис. 1.** Предполагаемый механизм восстановления хромата [Ni-Fe]-гидрогеназами СРБ [по 55].

ций Cr(VI) наступает ингибирование роста, которому сопутствует выделение энергии. По всей видимости, СРБ используют энергию, полученную при катаболизме лактата, на понижение вначале ОВП среды. Таким образом, восстановление Cr(VI) до Cr(III) может выполнять защитную функцию, позволяющую клеткам поддерживать условия внешней среды пригодными для жизни [58]. Эффект, оказываемый Cr(VI) на клетки, сопоставим с описанной ранее реакцией представителей рода *Desulfovibrio* на окислительные стрессы, при которой также наблюдалось отсутствие роста и изменение морфологии клеток [59].

Однако недавно было показано, что не только высокие концентрации Cr(VI) как таковые, но и снижение температуры, а также соотношение донор/акцептор и концентрации хромата оказывают значительное отрицательное влияние на жизнеспособность клеток *D. vulgaris* Hildenborough [60]. При этом поиск эффективных средств, защищающих клетки бактерий от токсического воздействия тяжелых металлов показал, что в процессе восстановления хромата цитрат может не только выступать как источник углерода, но и маскировать токсичность шестивалентного хрома (значение ингибирующей концентрации IC₅₀ цитрата было выше, чем у лактата), и что цитрат в водном растворе также может выполнять роль эффективного антиоксиданта [61].

Аккумуляция хрома клетками СРБ. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии и анализа химического состава клеток была исследована аккумуляция хрома клетками *D. vulgaris* Hildenborough, выращенных при довольно высокой (250 мкМ) концентрации Cr(VI). Элементный анализ показал, что аккумуляция восстановленного трехвалентного хрома в ранней логарифмической фазе роста культур происходила не только на поверхности клеток, но и на внешней и внутренней мембранах [3].

Минеральные отложения, как связанные с клетками, так и находящиеся в окружающей среде, имели одинаковые спектроскопические характеристики. Они состояли из Cr(III), фосфата и небольших количеств кальция – предполагаемая формула соединения Ca_{0,34}Cr_{0,7735}(PO₄). Таким образом, было получено прямое доказательство минерализации хрома на биологических мембранах с точным определением его степени окисления [3].

Несмотря на то, что специфическая транспортная система для хрома в клетках бактерий, по всей видимости, отсутствует, он может проникать в последние посредством сульфатного пути, как это было описано для *Pseudomonas fluorescens* [62]. По-видимому, и в клетки *D. vulgaris* Hildenborough хром проникает через сульфатную транспортную систему [3]. Внутриклеточное образование H₂S может вносить свой вклад в осаждение хроматов, однако данные электронной микроскопии говорят

в пользу именно биологического осаждения, происходящего с участием периплазматических или мембран-связанных цитохромов c₃ и гидрогеназ [3, 55].

Процесс восстановления Cr(VI) клетками часто рассматривается как адаптивная стратегия, позволяющая привести ОВП окружающей среды к оптимальному уровню [58]. Однако минеральные отложения уменьшают свободную площадь поверхности клетки, приводя, в конечном счете, к ее гибели в условиях высоких концентраций хромата и формированию отложений фосфатов хрома в среде [3]. Такая адаптация, по всей видимости, может использоваться СРБ не только в присутствии Cr(VI), но и ряда других токсичных металлов – Tc(VII), U(VI), Pd(II), V(V) и др.

Восстановление Cr(VI) смешанными культурами СРБ, иммобилизованными клетками и клетками в биопленках. Способность некоторых смешанных культур СРБ в составе биопленок к восстановлению даже 500 мкМ растворов Cr(VI) с использованием лактата весьма высока. Так, было показано, что через 48 ч культивирования 88% Cr(VI) было удалено из раствора [63].

Было проведено сравнение скорости восстановления Cr(VI) биопленками, содержащими клетки *D. norvegicum* и консорциум СРБ (названный СН10), выделенный из выработанной шахты золотодобычи, при росте на ацетате и СО₂ с Н₂ в качестве источника электронов. Периодическое культивирование с использованием прикрепленных биопленок консорциума СН10 показало, что в присутствии 500 мг/л H₂S (химическое восстановление хромата) за 15 мин было восстановлено 50 мг/л Cr(VI), в то время как в отсутствие H₂S клеткам требовался 1 ч, чтобы восстановить 16 мг/л Cr(VI) в ходе ферментативного процесса. При непрерывном культивировании биопленок, содержащих клетки СН10 и *D. norvegicum*, максимальная скорость восстановления Cr(VI) достигала 90 мг/л ч⁻¹ г⁻¹ белка. Необходимо отметить, что хромат оказывал негативное влияние на способность клеток СРБ к восстановлению сульфата, тем не менее, клетки сохраняли свою жизнеспособность [64].

СРБ, иммобилизованные на цеолите, способны удалять из загрязненной морской воды Cu(II), Ni(II), Cr(VI) в микромолярных концентрациях с эффективностью до 98, 90 и 99% соответственно [65].

Необходимо напомнить, что в присутствии больших концентраций сульфата образуется много сульфида, который ингибирует рост бактерий и снижает эффективность восстановления Cr(VI). Эксперимент с микрочастицами с добавлением органического субстрата-носителя (viscous carbon and sulfate-releasing colloidal substrates, VCSRCS, медленно высвобождает в среду источник углерода и сульфат), показал 100% восстановление ше-

стивалентного хрома с образованием осадков $\text{Cr}(\text{OH})_3$ и Cr_2O_3 . Добавление VCSRCS вызывало увеличение общей популяции бактерий, экспрессию гена *dsrA* (кодирующего α -субъединицу дисимилиационной (би)сульфитредуктазы в клетках СРБ), и восстановление $\text{Cr}(\text{VI})$. В составе микробного сообщества микрокосма (биобарьер) были детектированы представители родов *Exiguobacterium*, *Citrobacter*, *Aerococcus* и нескольких родов СРБ [66].

Консорциум СРБ, выделенный из загрязненных донных осадков у морского побережья Гонконга (КНР), практически полностью (98.5%) ферментативно восстанавливал 600 мкМ $\text{Cr}(\text{VI})$ за 168 ч со скоростью 0.5 г Cr^{6+} /г белка в час. При использовании $\text{Cr}(\text{VI})$ в качестве единственного акцептора электронов в бессульфатной питательной среде скорость его восстановления снижалась в два раза [67].

С использованием биореактора изучали также влияние начальных концентраций хромата, различных источников углерода, температуры и времени инкубации с загрязненными сточными водами на процессы восстановления сульфата и хрома(VI) консорциумом СРБ [68]. Было показано, что максимальное удаление хромата (96.8%) и сульфата (82%) происходило при росте на лактате, температуре 37°C и при начальной концентрации $\text{Cr}(\text{VI})$ 50 мг/л. Поскольку НАДН-зависимая хроматредуктазная активность обнаружена не была, это свидетельствовало об анаэробной природе консорциума [68]. В аналогичном проточном анаэробном биореакторе с активным илом при одновременном наличии в среде сульфатов и хроматов было показано два пути восстановления и удаления хроматов: химическое восстановление хромата образованным бактериями сульфидом (90%), а оставшиеся 10% приходились на прямое ферментативное восстановление хрома(VI) [69]. При анализе микробного сообщества биореактора оказалось, что СРБ составляли 11.1% всего бактериального сообщества, таким образом, они могли играть основную роль в удалении хроматов в биореакторе. Также, были детектированы бактерии рода *Microbacterium*, способные к использованию $\text{Cr}(\text{VI})$ как акцептора электронов, и возможно, они также отвечают за ферментативное восстановление хрома [69].

В поддержку смешанного механизма восстановления $\text{Cr}(\text{VI})$ в присутствии сульфата высказываются и другие исследователи [70], которые выделили и охарактеризовали из промышленных стоков, содержащих $\text{Cr}(\text{VI})$, высокоустойчивый к нему штамм *Desulfovibrio*, способный восстанавливать 500 мг/л хрома при pH 7.0 и 35°C в течение 24 ч. Кинетические расчеты показали, что основную роль в восстановлении хрома играет образо-

вание H_2S под действием бактериальных редуктаз [70].

Весьма эффективным для биоремедиации $\text{Cr}(\text{VI})$ оказался бионанокатализатор Bio-Pd(0), представляющий собой наночастицы палладия, восстановленного и затем адсорбированного полежащими клетками *D. vulgaris* NCIMB 8303 и *D. desulfuricans* NCIMB 8307 [71]. Авторами была предложена трехступенчатая схема очистки, при которой водород в качестве донора электронов вырабатывается *E. coli* в процессе переработки сахаросодержащих сточных вод, затем часть его используется *D. desulfuricans* для восстановления Pd(II) до Pd(0) из жидких стоков предприятий электронной промышленности с использованием гидрогеназы, а оставшееся количество водорода – в опосредованном Bio-Pd(0) восстановлении $\text{Cr}(\text{VI})$ до гораздо менее токсичного $\text{Cr}(\text{III})$. Процесс восстановления $\text{Cr}(\text{VI})$ с помощью каталитических суспензий клеток был схож с использованием Bio-Pd(0) как на основе *D. vulgaris*, так и *D. desulfuricans*, достигая 170 нмоль $\text{Cr}(\text{VI})$ /мг Bio-Pd(0) в час. При использовании иммобилизованных в агарозном матриксе клеток *D. vulgaris* наиболее эффективное восстановление было достигнуто при следующих условиях непрерывного культивирования – 7.5 мг Bio-Pd(0)/мл агара (соотношение сухой биомассы клеток к палладию 3 : 1), концентрации $\text{Cr}(\text{VI})$ 100 мкМ и скорости потока 1.75 мл/ч [71].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ КАДМИЯ КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Одними из самых устойчивых СРБ к высоким концентрациям кадмия являются штаммы *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 1926 и *Desulfococcus multivorans* DSM 2059. Они способны окислять лактат и осуществлять процесс сульфатредукции в присутствии 0.5 мМ CdCl_2 [72]. Трансмиссионная электронная микроскопия выявила аккумуляцию кадмия внутри клеток и в периплазме. Анализ известных генетических детерминант устойчивости бактерий к тяжелым металлам выявил у этих штаммов, а также у *Desulfomicrobium norvegicum* II, гены *smtAB* (имеющие высокую гомологию транслированных нуклеотидных последовательностей к металлотионеинам *Synechococcus* spp.), а также гены системы устойчивости к кадмию – *cadA* (кодирует АТФазу Р-типа, участвующую в транспорте ионов тяжелых металлов через клеточную мембрану), *cadC* (регуляторный ген для *cadA*) и *cadD* (кодирует металл-связывающий белок). Эти данные свидетельствуют о присутствии сразу нескольких генетических механизмов устойчивости к кадмию в клетках исследованных СРБ [72].

Использование СРБ для эффективной биоремедиации загрязненных кадмием почв может оказывать положительный экологический эффект. Хотя эти технологии и не приводят к уменьшению общего количества Cd, но значительно изменяют его распределение между геохимическими фракциями. Полученные результаты [33] показали, что внесение культур СРБ в переувлажненную почву способно существенно, примерно на 70%, снизить долю обменной фракции кадмия, которая легко поглощается растениями и попадает в пищевые цепи, и, таким образом, уменьшить его биодоступность в почве. Необходимо отметить, что скорость сульфатредукции падает при возрастании общей концентрации кадмия в загрязненной почве [33].

Результаты многолетних экспериментов в анаэробном биореакторе показали, что внесение Cd(II) приводило к усилению удаления сульфатов и образованию CdS. Большая часть водного Cd(II) (86.3%) удалялась в ходе реакций осаждения. Установлено, что образующиеся осадки были представлены преимущественно в карбонатной, Fe–Mn оксидной, сульфидно-связанной формах, на долю которых приходилось 92.6–93.9% общего содержания кадмия. Доминирующими СРБ в биореакторе оказались представители родов *Desulfurella*, *Desulforhabdus* и *Desulfovibrio*, а в качестве основных конкурентов с ними за утилизацию субстрата были идентифицированы метаногенные археи [73].

Также было продемонстрировано удаление кадмия из загрязненных стоков с помощью биореактора с имитацией анаэробных условий на заболоченных территориях. Внесение сульфата и органического субстрата в виде лигноцеллюлозы позволили, благодаря росту СРБ, существенно увеличить эффективность удаления кадмия и цинка за счет их осаждения в виде сульфидов [74].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ МЫШЬЯКА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Первой описанной СРБ, способной к восстановлению арсената, была *Desulfotomaculum auripigmentum*, первоначально описанная как штамм OREX-4 [75]. *D. auripigmentum* получает энергию в ходе восстановления сульфата или арсената (при концентрации до 5 мМ), причем последний является более энергетически выгодным. И арсенат-, и сульфатредукция ингибируются молибдатом [76]. Осаждение арсенита клетками СРБ происходит за счет сопряжения процессов восстановления S(VI) до S(-II) и арсената As(V) до As(III), приводящего к появлению в растворе сульфид-ионов, которые связываются с арсенидом, формируя нерастворимый трисульфид мышьяка (As₂S₃),

химическая стабильность которого сильно зависит от pH [75, 77–80].

Детальное изучение процесса аккумуляции мышьяка показало, что для него крайне важно определенное соотношение скоростей восстановления сульфата и арсената, так как этот процесс происходит только тогда, когда концентрация арсенита в растворе достигает 1 мМ, а содержание сульфита все еще невелико (0.01–0.1 мМ) [75]. Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что осадок As₂S₃ может быть локализован как вне-, так и внутриклеточно. Накопление его со стороны внутренней мембраны не случайно, так как, предположительно, восстановление арсената сопряжено с работой электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [75]. Восстановление сульфата клетками *D. auripigmentum* происходит только после того, как весь арсенат в растворе оказывается восстановленным до арсенита [75, 76].

В 2000 г. были описаны две новые СРБ, которые, в отличие от *D. auripigmentum*, были способны к одновременному восстановлению сульфата до сульфида и арсената до арсенита; лактат окислялся ими неполностью, до ацетата [56]. Штамм Ven-RA был отнесен к роду *Desulfovibrio*, штамм Ven-RB – к роду *Desulfomicrobium*. Скорости роста, а также процессов восстановления сульфата (8.3–9.6 мМ) и арсената (3.1–5.1 мМ) у этих СРБ были выше, чем у *D. auripigmentum* [56, 75]. Процесс сульфатредукции, осуществляемый штаммом Ven-RB, не ингибировался арсенатом, а арсенат мог использоваться в качестве конечного акцептора электронов при росте на минимальной питательной среде в отсутствие сульфата. Зависимая от бензилвиологена активность арсенатредуктазы была выше в клетках, растущих на сульфате/арсенате, по сравнению с клетками, растущими только на сульфате [56].

Штаммы Ven-RA и Ven-RB используют различные механизмы для восстановления арсената. В случае Ven-RA этот процесс не способен обеспечивать рост клеток. В геноме этого штамма был обнаружен гомолог гена *arsC*, входящего в R773 *ars* плазмидный оперон *E. coli*, который кодирует систему устойчивости к арсенату [56]. Предполагается наличие у штамма Ven-RA ArgC-подобного белка, обеспечивающего защиту клеток путем восстановления арсената As(V) до арсенита As(III). Это первый случай обнаружения системы устойчивости к арсенату у строгих анаэробов. *Desulfomicrobium* Ven-RB не имеет R773-подобной системы устойчивости к арсенату, вместо этого он осуществляет арсенатное дыхание, так как способен расти на минимальной питательной среде в присутствии As(V). Клетки Ven-RB, растущие на арсенате, обладают активной арсенатредуктазой (табл. 2), которая связана с клеточной мембраной. Она

представляет собой цитохром *c*-типа или ассоциирована с ним [56].

В удалении мышьяка из загрязненных вод клетками СРБ большую роль играет сопряженность процессов сульфат- и арсенатредукции, идущих в присутствии Fe(II), которое обеспечивает соосаждение сульфидов железа и мышьяка. Ключевыми ферментами в этих процессах являются диссимиляционная (би)сульфитредуктаза (*dsrAB*) и диссимиляционная арсенатредуктаза (*arsA*) [77].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ СЕЛЕНА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Несмотря на то, что СРБ, вероятно, не являются самыми эффективными микроорганизмами в биоремедиации экосистем от селена в высоких концентрациях, наличие у них металл-редуктазной активности широкого спектра действия делает целесообразным использование этих бактерий для биоремедиации сточных вод, в которых одновременно присутствуют несколько токсичных металлов и металлоидов. Необходимо отметить, что большинство СРБ весьма чувствительны к воздействию селена, так как он структурно сходен с сульфатом и способен ингибировать как ассимиляционную, так и диссимиляционную сульфатредукцию [81, 82]. На *D. vulgaris* Hildenborough было показано, что внесение Se в питательную среду приводит к сильному ингибированию синтеза периплазматических [Fe–Fe] и [Ni–Fe]-гидрогеназ, но к активации синтеза [Ni–Fe–Se]-гидрогеназы [83].

Восстановление оксианионов селена в концентрации 200 мкМ биопленками, содержащими клетки *D. norvegicum*, показало, что применение СРБ в биореакторах при росте на лактате (или водороде) и сульфате для эффективного удаления селена из загрязненных сточных вод потенциально возможно [84, 85]. В условиях лимитирования по сульфату селен ферментативно восстанавливался до селенида. При избытке сульфата восстановление селената преимущественно шло до элементного селена. Эксперименты с отмытыми клеточными суспензиями показали, что высокие концентрации сульфата ингибируют процесс специфического восстановления селената, тем не менее, увеличение биомассы за счет инкубации растущих клеток с избытком сульфата приводило к возрастанию скорости удаления вносимого селената. Ингибирующий эффект уменьшался при добавлении небольших количеств сульфита/тиосульфата [85].

Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что элементный селен откладывается в виде сферических гранул, ассоциированных с клетками СРБ. Локализация гранул была преиму-

щественно периплазматической, но встречались также и внеклеточные преципитаты [84, 85]. Эти преципитаты формируются за счет абиотической реакции с образуемым в ходе диссимиляционной сульфатредукции сульфидом в условиях низкого ОВП и темноты. Когда биопленки с СРБ помещали в питательную среду, содержащую селенит, внутри их матрикса формировались селено-серные гранулы [84].

Описана также способность СРБ восстанавливать селенаты и селениты с образованием летучих соединений. Так, некоторые представители рода *Desulfovibrio* продуцируют диметилселенид и диметилдиселенид, при этом *D. gigas* выделяет приблизительно в 10 раз больше этих соединений, чем *D. vulgaris* [86].

Эффективное, вплоть до 97%, удаление оксианионов селена из загрязненных вод (до 790 мкг Se/л) сообществом СРБ было также продемонстрировано с использованием анаэробных биореакторов с иловой площадкой и восходящим потоком жидкости (технология Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB) при нейтральном pH, температуре 30°C, с внесением сульфата и лактата. Рентгеноструктурный анализ показал, что селенаты в процессе восстановления частично конвертировались в коллоидные наночастицы Se⁰ и внутри клеток накапливался элементный селен [87].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АККУМУЛЯЦИЯ ТЕХНЕЦИЯ КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

С началом изучения восстановления U(VI) клетками *Micrococcus lactyliticus* предполагалась параллельная возможность использования восстановления пертехнетата микроорганизмами в качестве основы биотехнологического метода очистки загрязненных Tc(VII) стоков [46, 88], так как известно, что несколько форм низковалентных оксидов технеция нерастворимы. Изучение восстановления технеция клетками *D. desulfuricans*, имеющего большой биоремедиационный потенциал в отношении загрязненных сточных вод, подтвердило эти предположения [89].

Покоящиеся клетки *D. desulfuricans* эффективно осуществляли процесс восстановления Tc(VII), сопряженный с окислением различных доноров электронов. Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что восстановленный технеций осаждался в виде частиц нерастворимого низковалентного оксида эндогенно по периметру клеток. При наличии в среде лактата и сульфата наблюдалось формирование внеклеточных отложений сульфида технеция. Отношение сульфида к технецию в этих отложениях было очень высоким (5 : 1); в этом случае практически весь радионуклид был связан с H₂S и локализован внеклеточно. Оп-

тимальным донором электронов для биотрансформации технеция являлся водород, однако высокие скорости восстановления наблюдались и при росте клеток *D. desulfuricans* в проточном биореакторе на формиате и пирувате. Ферментативная активность сохранялась в течение нескольких недель и не ингибировалась кислородом [90].

В процесс восстановления Tc(VII) (TcO_4^-) клетками *D. desulfuricans* с использованием формиата или водорода в качестве донора электронов вовлечена периплазматическая гидрогеназа, поскольку соли Cu(II) ингибировали ферментативное восстановление технеция [90]. Однако этот процесс был устойчив к 10–100 мМ нитрата, в особенности, при росте культур на водороде. Оптимальные условия – pH 5.5 и температура 20°C [91]. Скорость восстановления Tc(VII) клетками *D. desulfuricans* с использованием H_2 (0.8 ммоль восстановленного технеция/г сухой биомассы в час) была в 64 раза выше, чем клетками *E. coli* дикого типа, обладающими формиат-водород-лиазным комплексом. Иммуобилизованные клетки *D. desulfuricans* в биореакторе восстанавливали 80% радионуклида за 1.5 ч, тогда как клетки *E. coli* дикого типа – за 24.3 ч [91].

Ферменты, отвечающие за восстановление технеция клетками СРБ, были впервые изучены у *D. fructosovorans*. Показано, что этот процесс *in vivo* обусловлен активностью периплазматической [Ni–Fe]-гидрогеназы. Это подтверждалось необходимостью присутствия H_2 в качестве донора электронов, ингибирующим эффектом Cu(II), устойчивостью к O_2 , а также резкой потерей способности к восстановлению Tc(VII) мутантным штаммом с делецией оперона [Ni–Fe]-гидрогеназы [92]. Константа Михаэлиса для восстановления технеция(VII) клетками *D. fructosovorans* (2 мМ) была выше, чем в случае *D. desulfuricans* (0.5 мМ) [91, 92]. Скорость восстановления Tc(VII) покоящихся клетками *D. fructosovorans* в отсутствие сульфата составляла 7 ммоль восстановленного технеция/г сухой биомассы в час [92], что было почти в 10 раз выше, чем у *D. desulfuricans*. С использованием экстрактов клеток и очищенной [Ni–Fe]-гидрогеназы *D. fructosovorans* было показано, что в присутствии водорода Tc(VII) восстанавливается до растворимого Tc(V) или выпадает в виде нерастворимого черного осадка, в зависимости от химического состава используемого буферного раствора. В данном процессе участвует также цитохром c_3 , являющийся физиологическим акцептором электронов для гидрогеназы и реактивирующий ее. Высокая эффективность и скорость ферментативного восстановления Tc(VII) клетками *D. fructosovorans* в широком спектре температур (10–40°C) и pH (от 5.5 до 8.0) делает этот микроорганизм весьма перспективным для применения в биоремедиации сточных вод от солей технеция [92].

ВОССТАНОВЛЕНИЕ УРАНА КЛЕТКАМИ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Традиционно считалось, что наблюдаемое в природе восстановление урана в сульфидогенных зонах является неферментативным и обусловлено присутствием сульфидов [93]. Позднее было показано, что сульфид плохо восстанавливает уран [94].

Впервые способность СРБ восстанавливать уран была показана на типовом штамме *D. desulfuricans* ATCC 29577 [51]. При использовании суспензии отмытых клеток в бикарбонатном буферном растворе с лактатом или H_2 в качестве донора электронов наблюдалось быстрое уменьшение количества уранил-иона U(VI) в растворе (от 1.0 до 0.15 мМ за 3 ч) и сопутствующее ему увеличение концентрации нерастворимого уранинита U(IV). В отсутствие донора электронов или же после термической обработки при 80°C, приводящей к гибели клеток, восстановления U(VI) не наблюдалось. Скорость ферментативного восстановления U(VI) была сравнима с таковой у железо(III)-редуцирующих бактерий и была гораздо выше скорости химического восстановления U(VI) сульфидом. Восстановленный уран имел внеклеточную локализацию; его можно было наблюдать в суспензии клеток в виде черного осадка, который состоял из U(IV)-содержащего минерала уранинита (настурана). Присутствие в растворе сульфата не оказывало значительного эффекта на восстановление U(VI), а добавление U(VI) не изменяло скорость сульфатредукции (эти процессы осуществлялись клетками параллельно); азид и предварительная аэрация клеток также не влияли на процесс восстановления урана *D. desulfuricans*. Авторы отмечали, что способность *D. desulfuricans* к ферментативному восстановлению урана делает этот микроорганизм перспективным для применения в биоремедиации загрязненных природных вод и антропогенных отходов, в частности, это позволяет использовать хемостат при условии внесения небольших количеств сульфата для обеспечения энергетического метаболизма клеток [51].

На интактных клетках *D. desulfuricans* DSM 642, иммуобилизованных в полиакриламидном геле, была показана возможность ферментативного восстановления Cr(VI), Mo(VI), Se(VI) и U(VI) в биореакторе при их начальных концентрациях 0.5–1.0 мМ с использованием лактата или водорода в качестве донора электронов. Выпадение в осадок нерастворимых форм металлов происходило в течение 25–37 ч с эффективностью удаления из раствора 86–96% [95].

В основе ферментативного восстановления U(VI) сульфатредукторами лежит цитохром c_3 , что было показано на клетках *D. vulgaris* Hildenborough [88]. Наблюдалось восстановление U(VI)

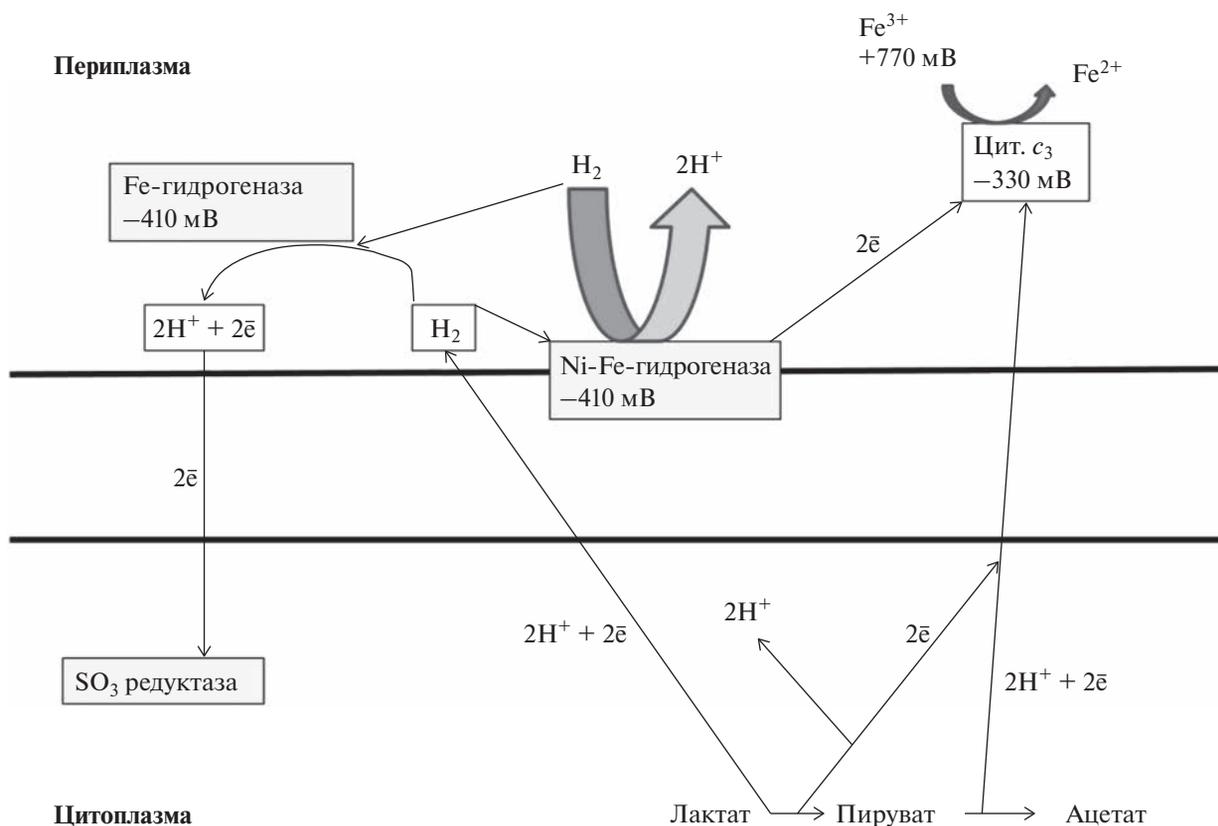


Рис. 2. Предполагаемая модель различных путей переноса электронов на сульфат с H_2 , лактата и пирувата с участием цитохрома c_3 и [Ni–Fe]-гидрогеназы [по 97].

фракцией цитохрома c_3 в присутствии H_2 и гидрогеназы. В то же время, гидрогеназа не продемонстрировала способности к самостоятельному восстановлению $U(VI)$. Быстрое восстановление $U(VI)$ сопровождалось последующим медленным осаждением уранинита. Дальнейшие исследования в этом направлении показали, что *D. vulgaris* способен расти как при дыхании только с $U(VI)$, так и при одновременной сульфатредукции. Биогенный сульфид неферментативно восстанавливал 76% $U(VI)$ и значительно увеличивал общую скорость восстановления в отсутствие $Fe(II)$. Образованные твердые вещества представляли собой нанокристаллы уранинита (UO_2), связанные с белками [96].

В 2004 г. описали детальный путь переноса электронов в процессе восстановления сульфата, $Fe(III)$ и $U(VI)$, объясняющий, почему данные металлы не могут обеспечивать рост СРБ [97]. Цитохром c_3 задействован в переносе электронов при окислении лактата и пирувата, но не H_2 , и одновременно представляет собой редуктазу для альтернативных акцепторов электронов с более высоким редокс-потенциалом, чем сульфат. Особое внимание в этой работе уделялось процессу трансформации клетками СРБ $U(VI)$ в $U(IV)$ с

высокой эффективностью, выше 90%. Однако несмотря на то, что СРБ могут выдерживать концентрации $U(VI)$ вплоть до 24 мМ [98], большинство из них, включая *D. desulfuricans*, не способны расти с использованием $U(VI)$ в качестве единственного акцептора электронов и нуждаются в сульфате [99]. Исключением являются *D. vulgaris* UFZ B490 [100] и *Desulfotomaculum reducens* [101]. Было предложено два альтернативных пути переноса электронов с органического донора в ЭТЦ, один из которых включает в себя цитохром c_3 , не задействованный в H_2 -зависимом восстановлении сульфата (рис. 2) [97]. Более поздние исследования показали, что в процесс восстановления $U(VI)$ вовлечена периплазматическая [Fe–Fe], а не [Ni–Fe]-гидрогеназа, которая участвует в восстановлении растворимого $Fe(III)$ [102].

Для *D. reducens*, клетки которого способны восстанавливать $U(VI)$ с бутиратом или H_2 в качестве донора электронов и содержат лишь один цитохром c -типа (тригемный цитохром c_{552} , кодируемый генами *dred_0700* и *dred_0701*), была предложена гипотеза переноса электронов с участием этого цитохрома и пула хинонов на $U(VI)$ или растворимый $Fe(III)$ как акцепторов электронов. Изучение электронных микрофотографий

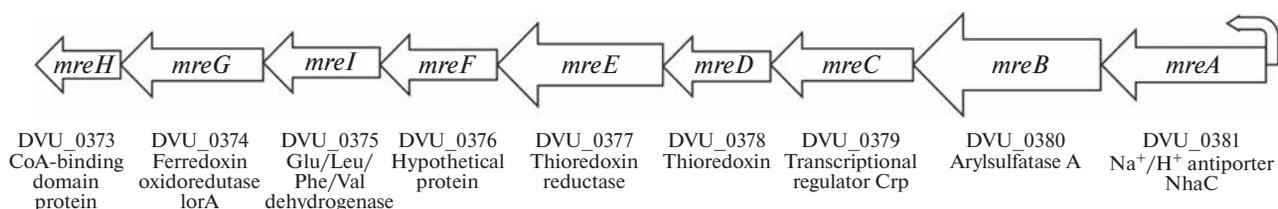


Рис. 3. Оперон *mre* сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio vulgaris*. Под каждым геном даны референтный номер кодирующей области согласно базе данных NCBI GenPept и название кодируемого белка.

D. reducens после восстановления U(VI) показало, что этот процесс ассоциирован с клеточной стенкой, поскольку аккумуляция U(IV) происходило по обеим сторонам цитоплазматической мембраны, а цитохром *c*₅₅₂ является наружным трансмембранным белком. Связанная с мембраной [Fe–Fe]-гидрогеназа также может быть вовлечена в восстановление U(VI), перенося электроны с H₂ на цитохром *c*₅₅₂, выполняющий роль терминальной редуктазы [103].

Было также показано, что Fe(III) и U(VI) должны быть восстановлены перед началом процесса сульфатредукции; из этого можно сделать вывод, что при взаимодействии клеток СРБ с тяжелыми металлами периплазматический цитохром *c*₃ осуществляет защитную функцию, как это было ранее описано для кислородных стрессов [59], способствуя немедленному восстановлению окисленных соединений с редокс-потенциалом, превышающим таковой для сульфата (220 мВ), что предотвращает окисление макромолекул клеток [97].

Процесс восстановления урана клетками *D. desulfuricans*, как и восстановление хрома клетками *D. vulgaris* (см. выше), не ингибируется наличием в растворе сульфата и солей никеля, магния, кобальта, цинка, магния, марганца, ванадия, молибдена и селена, но существенно снижается присутствием солей меди [98].

Для изучения подвижности U(VI) в щелочных условиях, при которых минералы железа распространены повсеместно, были протестированы высокие (30 мМ) и низкие (1 мМ) концентрации карбоната, а также присутствие и отсутствие Fe(III). При высоких концентрациях карбоната (рН 9.6) восстановление U(VI) до плохо растворимого U(IV) замедлялось. В условиях с низким содержанием карбоната имеет место микробное восстановление сульфатов и накопление водного сульфида, при этом уран удалялся из раствора в виде смеси фосфатов U(IV) и U(VI). В этих условиях такие СРБ, как *Desulfosporosinus* sp., значительно увеличивали численность своей популяции. Результаты показали влияние концентрации карбонатов на образование и растворимость урана в щелочных условиях, что позволяет контролировать захо-

ронения среднеактивных отходов радионуклидов и радиоактивно загрязненные почвы [104].

УЧАСТИЕ МЕТАЛЛ-РЕДУКТАЗ И ТИОРЕДОКСИН-ТИОРЕДОКСИНРЕДУКТАЗНОЙ СИСТЕМЫ ОПЕРОНА *MRE* В ВОССТАНОВЛЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛОИДОВ

Внимание исследователей было сосредоточено, в основном, на механизмах восстановления тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов цитохромами *c*-типа и периплазматическими гидрогеназами СРБ. Однако изучение мутантного штамма *D. desulfuricans* G20, лишенного активности цитохрома *c*₃, показало, что при невозможности восстанавливать U(VI) с использованием H₂, клетки сохраняют способность к росту и восстановлению урана при росте на лактате [105].

Для обнаружения дополнительного механизма, вовлеченного в восстановление U(VI) клетками *D. desulfuricans* G20, методом транспозонного мутагенеза была создана библиотека мутантных клонов, которые были проверены на устойчивость к U(VI) [15]. Был получен чувствительный мутант Thio1, не способный ни к росту в присутствии 2 мМ U(VI) (а также в присутствии 100 мкМ Cr(VI) и 20 мМ As(V)) в лактат-сульфатной среде, ни к восстановлению урана и хрома в суспензии отмытых клеток. Сайт транспозонной инсерции был идентифицирован как ген, кодирующий белок-рецептор цАМФ. Остальная часть оперона *mre* (metal reduction) содержала 8 генов, по меньшей мере, три из которых (*mreG*, *mreD* и *mreE*) вовлечены в процесс восстановления U(VI), Cr(VI) и As(V). Весь оперон мутанта имел негативную регуляцию экспрессии, в том числе и при инкубации клеток с U(VI) [15]. Этот оперон (за исключением отсутствия гена *mreI*) оказался схож с опероном *mre* в геноме *D. vulgaris* Hildenborough (рис. 3).

Продукт гена *mreG* оперона *mre* был аннотирован в базе данных NCBI как белок семейства пируват:ферредоксин/флаводоксин оксидоредуктаз. Очищенная оксидоредуктаза MreG *D. desulfuricans* демонстрировала способность к восстановлению как U(VI), так и Cr(VI) в присутствии тиоредаксина, тиоредаксинредуктазы и НАДФН,

обеспечивая эффективный цитоплазматический механизм восстановления этих металлов [15]. Таким образом, оксидоредуктаза *MreG* является принципиально новой цитоплазматической металл-редуктазой в клетках СРБ.

В геноме *Desulfotomaculum reducens* были обнаружены три открытые рамки считывания, аннотированные как гены, кодирующие тиоредоксины (*dred_0762*, *dred_0904* и *dred_2669*), но только один из них (*dred_2669*) образует оперон с геном тиоредоксинредуктазы (*dred_2670*) и, предположительно, может участвовать в восстановлении U(VI) [103].

Тиоредоксин служит цитоплазматическим донором электронов для многих биологических реакций [106]. В опероне *mre* он кодируется геном *mreD*, а тиоредоксинредуктаза – геном *mreE*. Для демонстрации участия тиоредоксина в работе металл-редуктазы *mreG* клетки *D. desulfuricans* G20 инкубировали с кадмием, поскольку он оказывает специфическое ингибирующее воздействие на тиоредоксины. Добавление 20 мкМ CdCl₂ в присутствии 2 мМ U(VI) вызывало ингибирование роста *D. desulfuricans* G20 на лактат-сульфатной среде. Суспензия отмытых клеток *D. desulfuricans* G20 при добавлении CdCl₂ также теряла способность к восстановлению U(VI). Этот факт свидетельствует о важной роли тиоредоксина в восстановлении урана(VI) до урана(IV), поскольку тиоредоксин является цитоплазматическим донором электронов для металл-редуктазы *mreG* [15].

Выключение оперона *mre* приводило к потере клетками способности расти в присутствии As(V). Было высказано предположение, что арсенат-редуктаза *D. desulfuricans* также нуждается в тиоредоксине как доноре электронов [15]. Авторами были охарактеризованы функции четырех из восьми генов оперона *mre* у *D. desulfuricans* – оксидоредуктазы (*mreG*), тиоредоксина (*mreD*), тиоредоксинредуктазы (*mreE*) и промотора (*mreC*). Функции четырех других генов остаются пока выясненными не до конца. Наличие чрезвычайно сходного оперона в геноме *D. vulgaris* (рис. 3) говорит об эволюционной консервативности данной генетической структуры, обуславливающей устойчивость клеток СРБ к токсичным металлам и металлоидам [15].

Полученные данные свидетельствуют о существовании у СРБ двух различных тиоредоксин/тиоредоксинредуктазных систем – TR1/Trx1 и TR3/Trx3 [107, 108]. Они были описаны для *D. vulgaris* Hildenborough: НАДФН-зависимая TR1/Trx1-система представляет собой типичные бактериальные тиоредоксин и тиоредоксинредуктазу, но наряду с ней в клетках присутствует альтернативная НАДФН-зависимая TR3/Trx3-система, сходная с TR/Trx-системой оперона *mre* *D. desulfuricans* G20 [107]. Сравнение тиоредоксинов

Trx1 и Trx3 *D. vulgaris* Hildenborough позволило обнаружить существенные различия в их строении, окислительно-восстановительных потенциалах и локализации в клетке [108]. Предполагается участие тиоредоксина Trx3 в работе металл-редуктазы, кодируемой опероном *mre*. Дальнейшее изучение этих клеточных систем способно привести к разработке эффективных методов непосредственного ферментативного восстановления неорганических токсичных соединений с помощью СРБ.

Таким образом, возможность биоремедиации от токсичных солей тяжелых металлов, металлоидов и радионуклидов с помощью СРБ представляет большой интерес как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Высокие скорости ферментативного восстановления целого ряда металлов, демонстрируемые многими штаммами СРБ, делают их пригодными для промышленного применения. Возможность использования в биореакторах покоящихся и иммобилизованных клеток СРБ, бионеорганических катализаторов, а также биопленок с участием смешанных культур, позволяет избежать накопления биомассы; рост бактерий на водороде и других доступных субстратах экономически выгоден и не приводит к дополнительному загрязнению стоков органическим веществом. Широкая специфичность металл-редуктазных систем СРБ и их функционирование в широком диапазоне pH (в том числе и низких) открывает большие возможности для биоремедиации шахтных и промышленных сточных вод, содержащих сразу несколько токсичных соединений металлов и металлоидов. В зависимости от окружающих условий, возможно внести необходимый минимум питательных веществ прямо в сточные воды, способствуя преимущественному развитию в них сообществ СРБ и очистке стоков *in situ*, либо использовать биореакторы, позволяющие точнее и эффективнее контролировать процессы восстановления.

Работа была выполнена в рамках гранта РФФИ 18-04-00622А “Трансформация тяжелых металлов и металлоидов сульфатредуцирующими и гетеротрофными алкалофильными бактериями”, а также госзадания по теме кафедры микробиологии МГУ “Физиология и биохимия фототрофных и хемотрофных микроорганизмов” (ЦИТиС № 121032300094-7) и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН (ЦИТиС № 122041100029-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lovley D.R. // Ann. Rev. Microbiol. 1993. V. 47. P. 263–290.

2. *Michel C., Brugna M., Aubert C., Bernadac A., Bruschi M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 55. № 1. P. 95–100.
3. *Goulhen F., Gloter A., Guyot F., Bruschi M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. № 6. P. 892–897.
4. *Li X., Fan M., Liu L., Chang J., Zhang J.* // Water Sci. Technol. 2019. V. 80. № 12. P. 2362–2372.
5. *Muyzer G., Stams A.J.M.* // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. № 6. P. 441–454.
6. *Ravenschlag K., Sahn K., Knoblauch C., Jørgensen B.B., Amann R.* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3592–3602.
7. *Jørgensen B.B., Findlay A.J., Pellerin A.* // Front Microbiol. 2019. V. 10. article 849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
8. *Minz D., Flax J.L., Green S.J., Muyzer G., Cohen Y., Wagner M., Rittmann B.E., Stahl D.A.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 10. P. 4666–4671.
9. *Korneeva V.A., Pimenov N.V., Krek A.V., Tourova T.P., Bryukhanov A.L.* // Microbiology. 2015. V. 84. № 2. P. 297–306.
10. *Ramsing N.B., Kühl M., Jørgensen B.B.* // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 11. P. 3840–3849.
11. *Dopson M., Johnson D.B.* // Environ Microbiol. 2012. V. 14. № 10. P. 2620–2631.
12. *Sorokin D.Y., Cherhyh N.A.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. № 2. P. 396–401.
13. *Jeanthon C., L'Haridon S., Cuffe V., Banta A., Reysenbach A.L., Prieur D.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. № 3. P. 765–772.
14. *Brioukhanov A., Pieulle L., Dolla A.* // Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. V. 2. / Ed. A. Mendez-Vilas. Badajoz, Formatex Research Center, 2010. P. 148–159.
15. *Li X., Krumholz L.R.* // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 15. P. 4924–4933.
16. *Bradl H.B.* Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation. London, Elsevier / Academic Press, 2005. 269 p.
17. *Herawati N., Suzuki S., Hayashi K., Rivai I.F., Koyoma H.* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000. V. 64. № 1. P. 33–39.
18. *Tokar E.J., Boyd W.A., Freedman J.H., Waalkes M.P.* Toxic Effects of Metals. / Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 8th Ed. / Ed. C.D. Klaassen. N.Y., McGraw Hill, 2013. P. 981–1030.
19. *Nriagu J.O., Pacyna J.M.* // Nature. 1988. V. 333. № 6169. P. 134–139.
20. *Nriagu J.O.* // Nature. 1989. V. 338. № 6210. P. 47–49
21. *Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J.* // Exp. Suppl. 2012. V. 101. P. 133–164.
22. *Kaczynski S.E., Kieber R.J.* // Environ. Sci. Technol. 1993. V. 27. № 8. P. 1572–1576.
23. *Richard F.C., Bourg A.C.M.* // Water Res. 1991. V. 25. № 7. P. 807–816.
24. *Wang Y., Su H., Gu Y., Song X., Zhao J.* // Onco. Targets Ther. 2017. V. 10. P. 4065–4079.
25. *Sharma D.C., Chatterjee C., Sharma C.P.* // Plant Sci. 1995. V. 111. № 2. P. 145–151.
26. *Venitt S., Levy L.S.* // Nature. 1974. V. 250. № 5466. P. 493–495.
27. *Chandra P., Sinha S., Rai U.N.* In: Phytoremediation of Soil and Water Contaminants. / Eds. E.L. Kruger, T.A. Anderson, J.R. Coats. ACS Symposium Series № 664. Washington DC, American Chemical Society, 1997. P. 274–282.
28. *Kotaš J., Stasicka Z.* // Environ. Pollut. 2000. V. 107. № 3. P. 263–283.
29. *Stein K., Schwedt G.* // Fresenius' J. Anal. Chem. 1994. V. 350. P. 38–43.
30. *Bernhoft R.A.* // ScientificWorldJournal. 2013. ID 394652. <https://doi.org/10.1155/2013/394652>
31. *Wedepohl K.H.* // Geochim. Cosmochim. Acta. 1995. V. 59. № 7. P. 1217–1232.
32. *Nordberg G.F., Nogawa K., Nordberg M., Friberg L.* Cadmium / Handbook on the Toxicology of Metals. / Eds. G.F. Nordberg, B.F. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg. Amsterdam, Elsevier, 2007. P. 445–486.
33. *Jiang W., Fan W.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1140. P. 446–454.
34. *Stoepler M.* Arsenic / Elements and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis, and Biological Relevance. 2nd Ed. / Eds. E. Merian, M. Anke, M. Inhat, M. Stoepler. Weinheim, Wiley-VCH, 2004. P. 1321–1364.
35. *Rüde T.R.* Beiträge zur Geochemie des Arsens. / Karlsruher Geochemische Hefte: Schriftenreihe des Instituts für Petrographie und Geochemie. 1996. V. 10. P. 206–210.
36. *Smedley P.L., Kinniburgh D.G.* // Appl. Geochem. 2002. V. 17. № 5. P. 517–568
37. *Sadler R., Olszowy H., Shaw G., Biloft R., Connell D.* // Water Air Soil Pollut. 1994. V. 78. № 1. P. 189–198.
38. *Chappell W., Beck B., Brown K., Chaney R., Cothorn C., Irgolic K., North D., Thornton I., Tsongas T.* // Environ. Health Perspect. 1997. V. 105. № 10. P. 1060–1067.
39. *Bissen M., Frimmel F.H.* // Acta Hydrochim. Hydrobiol. 2003. V. 31. № 1. P. 9–18.
40. *Tchounwou P.B., Patlolla A.K., Centeno J.A.* // Toxicol. Pathol. 2003. V. 31. № 6. P. 575–588.
41. *Hughes M.F.* // Toxicol. Lett. 2002. V. 133. № 1. P. 1–16.
42. *McNeal J.M., Balistrieri L.S.* Geochemistry and Occurrence of Selenium: an Overview. In: Selenium in Agriculture and the Environment. V. 23. / Ed. L.W. Jacobs. Soil Science Society of America, 1989. P. 1–13.
43. *Lakin H.W.* // Geol. Soc. Am. Bull. 1973. V. 83. № 1. P. 181–190.
44. *Emsley J.* Uranium / Nature's Building Blocks: An A to Z Guide to the Elements. / Ed. J. Emsley. Oxford, Oxford University Press, 2001. P. 476–482.
45. *Arfsten D.P., Still K.R., Ritchie G.D.* // Toxicol. Ind. Health. 2001. V. 17. № 5–10. P. 180–191.
46. *Macaskie L.E.* // Crit. Rev. Biotechnol. 1991. V. 11. № 1. P. 41–112.
47. *Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E., Fellows R.J.* // Health Phys. 1989. V. 57. № 2. P. 281–288.

48. *Гвоздяк П.И., Могилевич Н.Ф., Рьльский А.Ф., Грущенко Н.И.* // Микробиология. 1986. Т. 55. № 6. С. 962–965.
49. *Yamamoto K., Kato J., Yano T., Ohtake H.* // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 41. № 1. P. 129–133.
50. *Hardoyo J.K., Ohtake H.* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1991. V. 37. P. 519–522.
51. *Lovley D.R., Phillips E.J.P.* // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 3. P. 850–856.
52. *Coleman M.L., Hedrick D.B., Lovley D.R., White D.C., Pye K.* // Nature. 1993. V. 361. P. 436–438.
53. *Lovley D.R., Phillips E.J.P.* // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 2. P. 726–728.
54. *Assfalg M., Bertini I., Bruschi M., Michel C., Turano P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 15. P. 9750–9754.
55. *Chardin B., Giudici-Ortoni M.T., De Luca G., Guigliarelli B., Bruschi M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 63. № 3. P. 315–321.
56. *Macy J.M., Santini J.M., Pauling B.V., O'Neill A.H., Sly L.I.* // Arch. Microbiol. 2000. V. 173. № 1. P. 49–57.
57. *Mabbett A.N., Lloyd J.R., Macaskie L.E.* // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 79. № 4. P. 389–397.
58. *Chardin B., Dolla A., Chaspoul F., Fardeau M.L., Gallice P., Bruschi M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 60. № 3. P. 352–360.
59. *Cypionka H.* // Annu. Rev. Microbiol. 2000. V. 54. P. 827–848.
60. *Franco L.C., Steinbeisser S., Zane G.M., Wall J.D., Fields M.W.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. № 6. P. 2839–2850.
61. *Gu W., Zheng D., Li D., Wei C., Wang X., Yang Q., Tian C., Cui M.* // Chemosphere. 2021. V. 279. Article 130437. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130437>
62. *Ohtake H., Cervantes C., Silver S.* // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 8. P. 3853–3856.
63. *Smith W.L., Gadd G.M.* // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 88. № 6. P. 983–991.
64. *Battaglia-Brunet F., Foucher S., Denamur A., Ignatiadis I., Michel C., Morin D.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. № 3. P. 154–159.
65. *Kim I.H., Choi J.-H., Joo J.O., Kim Y.-K., Choi J.-W., Oh B.-K.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 25. № 9. P. 1542–1546.
66. *Lin W.-H., Chen C.-C., Ou J.-H., Sheu Y.-T., Hou D., Kao C.-M.* // Chemosphere. 2022. V. 295. Article 133877.
67. *Cheung K.H., Gu J.D.* // Chemosphere. 2003. V. 52. № 9. P. 1523–1529.
68. *Singh R., Kumar A., Kirrolia A., Kumar R., Yadav N., Bishnoi N.R., Lohchab R.K.* // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. № 2. P. 677–682.
69. *Qian J., Wei L., Liu R., Jiang F., Hao X., Chen G.-H.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. Article 23694. <https://doi.org/10.1038/srep23694>
70. *Li X., Fan M., Ling Liu L., Jinghua Chang J., Jiawen Zhang J.* // Water Sci. Technol. 2019. V. 80. № 12. P. 2362–2372.
71. *Humphries A.C., Mikheenko I.P., Macaskie L.E.* // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 94. № 1. P. 81–90.
72. *Naz N., Young H.K., Ahmed N., Gadd G.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 8. P. 4610–4618.
73. *Jiang Y., Zhang J., Wen Q., Zheng J., Zhang Y., Wei Q., Qin Y., Zhang X.* // Biodegradation. 2022. V. 33. № 3. P. 239–253.
74. *Gonçalves M.M., de Oliveira Mello L.A., da Costa A.C.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 147. № 1–3. P. 97–105.
75. *Newman D.K., Beveridge T.J., Morel F.M.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 5. P. 2022–2028.
76. *Newman D.K., Kennedy E.K., Coates J.D., Ahmann D., Ellis D.J., Lovley D.R., Morel F.M.* // Arch. Microbiol. 1997. V. 168. № 5. P. 380–388.
77. *Upadhyaya G., Clancy T.M., Brown J., Hayes K.F., Raskin L.* // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. № 21. P. 11702–11709.
78. *Le Pape P., Battaglia-Brunet F., Parmentier M., Joulian C., Gassaud C., Fernandez-Rojo L., Guigner J.-M., Ikogou M., Stetten L., Olivi L., Casiot C., Morin G.* // J. Hazard. Mater. 2017. V. 321. P. 764–772.
79. *Sun J., Hong Y., Guo J., Yang J., Huang D., Lin Z., Jiang F.* // Water Res. 2019. V. 151. P. 362–370.
80. *Gao J., Zheng T., Deng Y., Jiang H.* // Sci. Total Environ. 2021. V. 768. Article 144709.
81. *Taylor B., Oremland R.* // Curr. Microbiol. 1979. V. 3. P. 101–103.
82. *Newport P.J., Nedwell D.B.* // J. Appl. Bacteriol. 1988. V. 65. № 5. P. 419–423.
83. *Valente F.M., Almeida C.C., Pacheco I., Carita J., Saraiva L.M., Pereira I.A.* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 9. P. 3228–3235.
84. *Hockin S.L., Gadd G.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 12. P. 7063–7072.
85. *Hockin S.L., Gadd G.M.* // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 5. P. 816–826.
86. *Michalke K., Wickenheiser E.B., Mehring M., Hirner A.V., Hensel R.* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 7. P. 2791–2796.
87. *Lenz M., Van Hullebusch E.D., Hommes G., Corvini P.F., Lens P.N.* // Water Res. 2008. V. 42. № 8–9. P. 2184–2194.
88. *Lovley D.R., Widman P.K., Woodward J.C., Phillips E.J.P.* // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 11. P. 3572–3576.
89. *Lloyd J.R., Nolting H.F., Solé V.A., Bosecker K.* // Geomicrobiol. J. 1998. V. 15. № 1. P. 45–58.
90. *Lloyd J.R., Ridley J., Khizniak T., Lyalikova N.N., Macaskie L.E.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 6. P. 2691–2696.
91. *Lloyd J.R., Thomas G.H., Finlay J.A., Cole J.A., Macaskie L.E.* // Biotechnol. Bioeng. 1999. V. 66. № 2. P. 122–130.
92. *De Luca G., de Philip P., Dermoun Z., Rousset M., Verméglio A.* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 10. P. 4583–4587.
93. *Mohagheghi A., Updegraff D.M., Goldhaber M.B.* // Geomicrobiol. J. 1985. V. 4. № 2. P. 153–173.
94. *Lovley D.R., Phillips E.J.P., Gorby Y.A., Landa E.R.* // Nature. 1991. V. 350. P. 413–416.

95. Tucker M.D., Barton L.L., Thomson B.M. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998. V. 20. № 1. P. 13–19.
96. Zhou C., Vannela R., Hyun S.P., Hayes K.F., E Rittmann B.E. // *Environ. Sci. Technol.* 2014. V. 48. № 12. P. 6928–6937.
97. Elias D.A., Suflita J.M., McInerney M.J., Krumholz L.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. № 1. P. 413–420.
98. Lovley D.R., Phillips E.J.P. // *Environ. Sci. Technol.* 1992. V. 26. № 11. P. 2228–2234.
99. Tucker M.D., Barton L.L., Thomson B.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996. V. 46. P. 74–77.
100. Pietzsch K., Hard B.C., Babel W.A. // *J. Basic Microbiol.* 1999. V. 39. P. 365–372.
101. Tebo B.M., Obraztsova A.Y. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998. V. 162. № 1. P. 193–198.
102. Park H.S., Lin S., Voordouw G. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008. V. 93. № 1–2. P. 79–85.
103. Junier P., Junier T., Podell S., Sims D.R., Detter J.C., Lykidis A., Han C.S., Wigginton N.S., Gaasterland T., Bernier-Latmani R. // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. № 10. P. 2738–2754.
104. Townsend L.T., Kuippers G., Lloyd J.R., Natrajan L.S., Boothman C., Mosselmans J.F.W., Shaw S., Morris K. // *ACS Earth Space Chem.* 2021. V. 5. № 11. P. 3075–3086.
105. Payne R.B., Gentry D.M., Rapp-Giles B.J., Casalot L., Wall J.D. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 6. P. 3129–3132.
106. Holmgren A. // *Ann. Rev. Biochem.* 1985. V. 54. P. 237–271.
107. Pieulle L., Stocker P., Vinay M., Nouailler M., Vita N., Brasseur G., Garcin E., Sebban-Kreuzer C., Dolla A. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 10. P. 7812–7821.
108. Garcin E.B., Bornet O., Elantak L., Vita N., Pieulle L., Guerlesquin F., Sebban-Kreuzer C. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 3. P. 1688–1697.

Application of Sulfate-reducing Bacteria in Bioremediation from Heavy Metals and Metalloids (Review)

A. L. Bryukhanov^a and T. V. Khijniak^{b, *}

^a *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow 119234 Russia*

^b *Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, 119071 Russia*

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

Pollution of the environment with heavy metals, metalloids and radionuclides is a global problem that seriously affects the state of the biosphere. In particular, chromium compounds have a toxic, mutagenic and carcinogenic effect. The main principle of purification of anthropogenic and natural ecosystems from chromates is the reduction of Cr(VI) to Cr(III), the salts of which are significantly less toxic and insoluble. However, currently used electrochemical and ion-exchange cleaning methods are quite expensive and require the use of special reagents. At the same time, sulfate-reducing bacteria (SRB) are of particular interest for bioremediation of this kind, since many of them are very resistant to high concentrations of heavy metals and are able to effectively reduce them in the presence of hydrogen as an electron donor. The review summarizes known data on the interaction of heavy metals, metalloids and radionuclides with SRB. The features of the metabolism of these microorganisms, leading to intracellular accumulation of heavy metals and metalloids, are considered. Complex and finely regulated enzymatic mechanisms for the reduction of toxic metals (using various cytochromes, hydrogenases, oxidoreductases, highly specific metal reductases, and thioredoxin/thioredoxin-reductase systems), as well as the possibility of using immobilized cells and biofilms of SRB in the effective bioremediation of natural waters, soils, and industrial effluents, are described.

Keywords: sulfate-reducing bacteria (SRB), bioremediation, heavy metals, metalloids, radionuclides, metal reductases

УДК 579.61

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК (ОБЗОР)

© 2023 г. О. И. Гулий¹ *, С. С. Евстигнеева¹, Л. А. Дыкман¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук” (ИБФРМ РАН), Саратов, 410049 Россия

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 05.08.2022 г.

После доработки 12.09.2022 г.

Принята к публикации 25.09.2022 г.

Технология фагового дисплея антител произвела революцию в области иммунодетекции бактерий. Данная технология позволяет экспрессировать антитело, слитое с белком оболочки нитевидного бактериофага. Применение фагового дисплея позволяет получать высокоаффинные антитела, минуя этап иммунизации животных, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с нескольких месяцев до нескольких недель, заметно удешевляя процесс. Данные преимущества делают фаговые антитела важным инструментом для детекции бактерий. В работе представлено краткое описание технологических приемов при получении фаговых антител к микробным клеткам. Обсуждаются возможности и перспективы применения фаговых антител в качестве селективного агента в аналитических системах, в том числе в биосенсорах.

Ключевые слова: технология фагового дисплея, микробные клетки, биосенсоры

DOI: 10.31857/S0555109923020083, **EDN:** LLHLMZ

Успехи современной биотехнологии, медицины и сельского хозяйства зачастую зависят от того, насколько быстро можно обнаружить специфические антигены. Антитела, благодаря специфическому связыванию с комплементарными участками антигенов, используются для решения ряда биотехнологических задач [1–5].

Наиболее распространенным вариантом получения антител, обладающих специфичностью к конкретному антигену, является иммунизация, в ходе которой данный антиген вводится вместе с компонентами, которые усиливают иммунный ответ (адьювантами), в организм животного (кролика, мыши, овцы и др.). Сыворотка крови иммунизированного животного будет содержать поликлональные антитела, представляющие собой гетерогенную по строению, эпитопной специфичности и аффинности популяцию антител [6]. Недостатком поликлональных антител является их специфичность к ряду детерминант антигена [7].

Следует отметить, что эффективность диагностических иммунохимических методов зависит, в первую очередь, от качества используемых специфических антител. Поэтому дальнейшее развитие методов получения антител привело к созданию гибридной технологии. Получаемые при

помощи данной технологии моноклональные антитела продуцируются одним клеточным клоном, узнают один эпитоп и сохраняют свои свойства во многих генерациях гибридной клетки [8]. Высокая специфичность моноклональных антител при взаимодействии с антигенами, а также возможность их оперативного получения, позволяют использовать данные антитела для исследования и детекции разнообразных по природе и свойствам антигенов. В настоящее время с привлечением гибридной технологии получены антитела, которые применяются для выявления различных соединений (гормонов, витаминов, лекарственных препаратов), патогенных микроорганизмов и их токсинов, а также успешно используются в иммунотерапии [5, 9]. К примеру, при использовании моноклональных антител показана возможность определения холерного токсина [10], рекомбинантных и вирусных белков лихорадки Эбола и Марбурга [11].

Большой научный и практический интерес представляет фаговый дисплей, направленный на получение и наработку антител к известным антигенам. Фаговые антитела в качестве биорецепторов имеют ряд преимуществ перед стандартными иммуноглобулинами: они намного меньше по размеру и обычно содержат менее 100 аминокис-

лотных остатков, обладают высокой стабильностью и химической устойчивостью, а также дешевле в производстве. Таким образом, фаговые антитела отлично подходят для создания биосенсоров, которые могут найти применение во многих сферах деятельности, в том числе в пищевой промышленности, медицине, фармакологии, биотехнологии, экологии и т.д.

Несмотря на то, что с начала 2000 гг. было опубликовано несколько блестящих обзоров, посвященных фаговому дисплею антител [12–14], проблема их использования в аналитических методах не нашла достаточно полного освещения в литературе. Поэтому цель настоящего обзора заключается не только в описании преимуществ технологии фагового дисплея применительно к получению специфических антител, но и в оценке возможности их использования для детектирования бактерий.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО

Свойство аффинности предоставляет уникальные возможности для изучения взаимодействий, в частности, антиген-антитело или бактериофаг-микробная клетка [15–18]. Под аффинным взаимодействием понимают способность двух или более молекул к образованию химической связи, в том числе между паратопом антитела и эпитопом антигена. Аффинитет, или прочность комплексообразования антигена с антителом, можно количественно измерить при помощи определения константы ассоциации.

Важную функцию при взаимодействии антитела с антигеном выполняют гипервариабельные участки молекулы антитела — области **CDR** (complementarity determining regions). Данные участки представляют собой петли, расположенные между β -складками, причем по протяженности и аминокислотной последовательности у различных антител они могут существенно отличаться. Формируемая из шести петель **CDR** трехмерная структура антитела участвует в распознавании комплементарного ей эпитопа на поверхности антигена [7].

Аминокислотные остатки (а.о.), входящие в состав **CDR** и взаимодействующие с эпитопом, называют участками, определяющими специфичность, или участками **SDR** (specificity determining regions). Во взаимодействии антигена и антитела могут участвовать от 5 до 15 а.о., входящих в состав эпитопа, и, как правило, столько же а.о. паратопа [19]. Помимо а.о., непосредственно контактирующих с эпитопом, ключевую роль в распознавании антигена играют а.о., которые выполняют структурную функцию и обеспечивают необходимую конформацию **CDR**-петель, тем самым осуществляя правильное взаимное располо-

жение в пространстве взаимодействующих поверхностей [20]. Связь антигена с антителом является обратимой и осуществляется за счет водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий, а также за счет сил Ван-дер-Ваальса. Несмотря на то, что данные виды связей слабее ковалентной, в совокупности они обеспечивают высокоаффинное взаимодействие эпитопа и паратопа [21].

ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ЭТАПЫ ТЕХНОЛОГИИ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Д. Маккаферти с соавт. [22] предложили использовать метод фагового дисплея антител. В своей работе авторы показали возможность отбора антигенсвязывающих фрагментов антител (Fab), которые экспонированы на поверхности нитевидного фага, на иммобилизованном антигене.

Предложенный метод получения рекомбинантных моноклональных антител стал широко использоваться и зарекомендовал себя как высокоэффективный подход для изучения белок-белковых, белок-пептидных, ДНК-белковых взаимодействий [23]. Метод позволяет использовать бактериофаги для соотнесения генотипа (гены вариабельной области антитела) с фенотипом (белок с требуемой связывающей функцией). Для выявления соответствия между генотипом и фенотипом требуется тщательный скрининг и амплификация белковых библиотек в процессе, называемом *in vitro* селекцией, который аналогичен естественному отбору [24, 25].

Данная технология является альтернативой гибридомной технологии, при этом фаговая система заменяет основные этапы работы по иммунизации животных процедурами манипулирования с ДНК и бактериями. При этом существенно сокращается время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела (с месяцев до недель), а также снижаются затраты на их наработку. Молекулярно-направленные аффинные лиганды играют важную роль в исследовании патогенеза ряда заболеваний [26–29], используются в фармацевтических разработках [30–32], приложениях для нанотехнологий [33], дизайне агентов молекулярной визуализации [34–37]. Кроме того, антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, проходят несколько этапов отбора по аффинности и могут быть использованы в качестве селективных рецепторов в составе биосенсоров [38, 39].

Суть технологии фагового дисплея антител состоит в получении высокоаффинных антител (или их фрагментов), экспонированных в составе оболочки бактериофагов.

Основные этапы данной технологии включают:

- конструирование фаговых библиотек или выбор из имеющихся;

- обогащение фаговой библиотеки при помощи аффинной селекции (биопэннинг).

При использовании метода фагового дисплея в геном бактериофагов встраивают последовательность, кодирующую ген химерного белка, продукт которого состоит из какого-либо фрагмента антитела и белка поверхности фаговой частицы [40]. Одним из наиболее распространенных фагов, применяемых для дисплея, является бактериофаг M13, на поверхности которого представлены фрагменты антител, связанные с белками рIII, рIV и рVIII капсида фага [41].

Селекцию частиц из фаговой библиотеки проводят, используя их свойства комплементарно связываться с антигеном. Используют различные формы отбора фаговых частиц, включая их прямое связывание с антигеном, который присоединен к определенной матрице или же сорбирован на чашках или иммунотюбах, а также с антигеном, локализованным непосредственно на поверхности клеток. При получении антител к гаптенам, последние предварительно конъюгируют с белком-носителем. Отбор фаговых частиц может осуществляться не только на пластиковой подложке, но и на магнитных шариках. Для истощения библиотек авторы работы [42] предложили использовать парамагнитные гранулы с полистироловым покрытием, на которых были иммобилизованы антигены. Такой способ отбора связывающихся фаговых частиц оказался более эффективным, так как повышал площадь активной поверхности, на которой происходило связывание. Кроме того, существенно упростилась процедура отмывки, было получено 1.5-кратное повышение специфичности селекции по сравнению с традиционными методами. Также был разработан метод селекции антител из комбинаторных фаговых библиотек с использованием конъюгатов антигенов (в том числе гаптен) с наночастицами золота [43].

Из фаговых частиц, прошедших не менее 3–6 раундов селекции, выделяют ДНК, в которой определяют последовательность нуклеотидов, кодирующих интересующие фрагменты антител [39, 44]. Таким образом, в результате использования данного метода, возможно получить не только высокоаффинные антитела, но и их нуклеотидную последовательность, которая также может быть клонирована и представлена в виде фрагментов иммуноглобулинов [45].

Как правило, отбор фаговых частиц библиотеки, называемый также биопэннинг, включает следующие этапы (рис. 1):

- клоны библиотеки инкубируют с иммобилизованным антигеном;
- удаляют при помощи отмывки фаговые частицы, не связавшиеся с антигеном;
- связавшиеся фаговые частицы элюируют;

- заражают отобранными клонами бактериальные клетки (*Escherichia coli*);

- проводят амплификацию и выделение аффинных клонов [46].

Длительность процедуры получения антител методом фагового дисплея зависит от иммуногенности антигенов, метода их иммобилизации, и соответственно количества раундов биопэннинга. В зависимости от этого процедура занимает от нескольких часов до нескольких суток.

КОМБИНАТОРНЫЕ ФАГОВЫЕ БИБЛИОТЕКИ

Комбинаторные фаговые библиотеки антител представляют собой своеобразный аналог популяций В-лимфоцитов, каждый из которых производит один тип антител определенной специфичности, однако бактериофаги, входящие в состав библиотеки, экспонируют на своей поверхности не целые природные антитела, а лишь их фрагменты, чаще всего одноцепочечное антитело (scFv – single chain variable fragment) или Fab-фрагмент (рис. 2) [47–49].

В некоторых исследованиях применяли нестандартные по свойствам антитела природного происхождения. Например, животные из семейства верблюдовых (*Camelidae*), к которому относятся верблюды, ламы и альпаки, обладают как обычными IgG (IgG1), так и неканоничными подклассами IgG (IgG2 и IgG3), которые состоят только из двух тяжелых цепей. Подобные антитела могут быть использованы в качестве перспективного биораспознающего элемента при решения различных прикладных задач в биотехнологии [50].

Каждый из двух антигенсвязывающих сайтов антитела тяжелой цепи образован только одним варибельным доменом (VНН). Способность VНН функционировать в отсутствие двух доменов VL и CH1 в 1997 г. подтолкнула ученых к созданию первых самостоятельных рекомбинантных молекул VНН методами геной инженерии [51]. Эти молекулы были названы однодоменными антителами (sdAb). Установлено несколько преимуществ использования sdAb перед scFv: высокая стабильность, способность успешно ренатурировать после нагрева или химического воздействия, небольшие размеры (15 кДа) и кодируемость одним геном длиной 380 нуклеотидных пар [51, 52]. Показано, что подобные антитела имеют больший потенциал для использования в иммунобиотехнологии и медицине [51–53].

Общая схема получения комбинаторной фаговой библиотеки выглядит следующим образом.

1. Из иммунных или интактных В-лимфоцитов человека, мыши, кролика, цыпленка, свиньи, собаки, обезьяны, овцы, коровы и др. выделяют

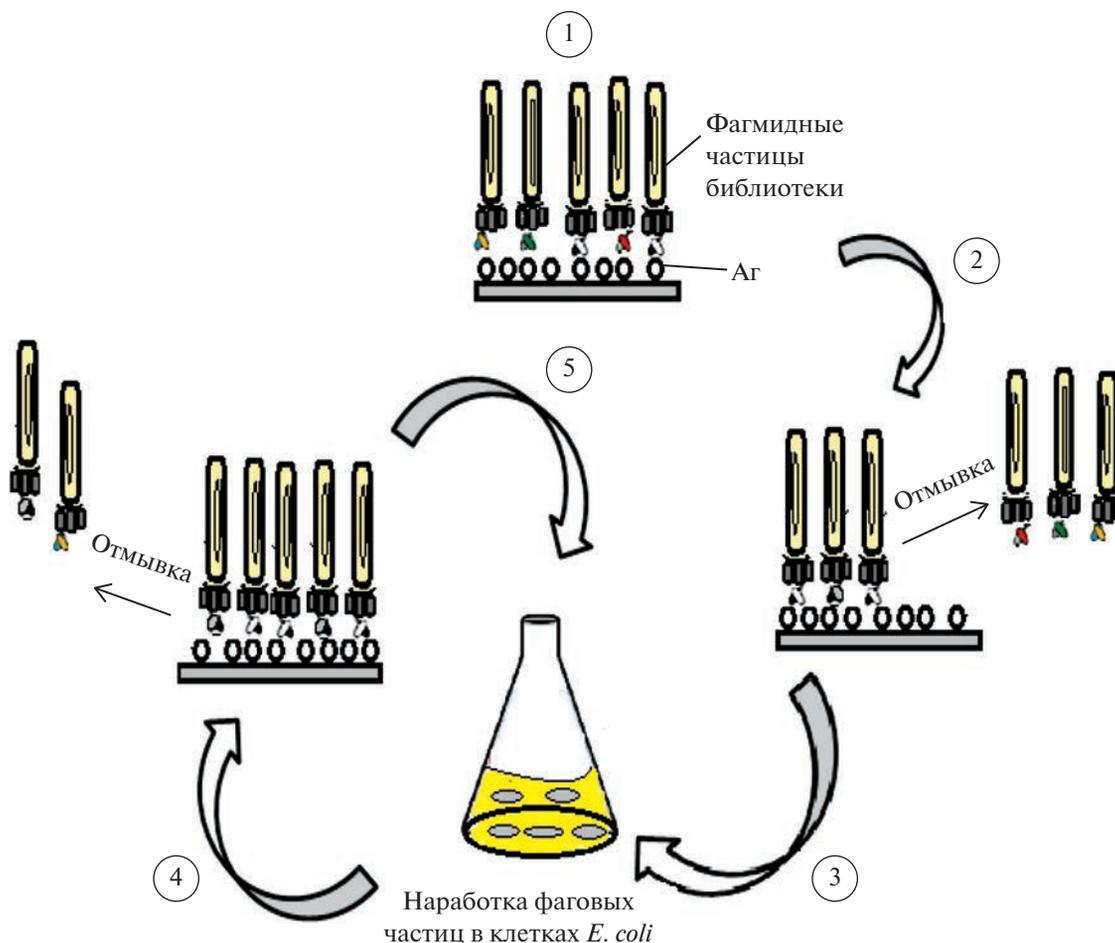


Рис. 1. Схема аффинной селекции фаговых частиц из библиотеки: 1 – инкубация фагидных частиц библиотеки (на поверхности которых представлены фрагменты антител) с иммобилизованным антигеном; 2 – отмывка не связавшихся с антигеном фаговых частиц; 3 – элюция связавшихся с антигеном фаговых частиц и их наработка в клетках *E. coli*; 4 – следующий раунд селекции фаговых частиц библиотеки, включающий в себя повторную инкубацию отобранных после первого цикла частиц с антигеном и отмывку низкоаффинных фаговых частиц; 5 – элюция высокоаффинных фаговых частиц библиотеки и инфицирование ими клеток *E. coli*.

мРНК и клонируют гены scFv, Fab-фрагментов или др.

2. Данные гены встраивают в фагиду в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок капсида (обычно рIII).

3. Полученным репертуаром фагид заражают клетки *E. coli*, в которых происходит экспрессия фагидных генов и сборка вирионов. В составе капсидных белков вирионов будут экспонированы чужеродные фрагменты антитела. В зависимости от выбранной векторной системы этот этап проходит с использованием хелперных фагов или без них.

Таким образом получают популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности определенный антигенсвязывающий домен [54, 55].

ТИПЫ КОМБИНАТОРНЫХ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК

Существует два принципиально разных типа библиотек: естественные (наивные и иммунные) и синтетические. Наивные и иммунные библиотеки конструируют, используя естественным образом реорганизованные гены, кодирующие переменные домены иммуноглобулинов интактных или иммунных к какому-либо антигену доноров, соответственно. Для этого выделяют мРНК клеток лимфоидного ряда, продуцирующих антитела. Эта мРНК подвергается обратной транскрипции в кДНК, которая используется для ПЦР генов, кодирующих фрагменты антител (рис. 3) [56]. Преимущество этого метода заключается в том, что полученные антитела будут правильной конформации, так как их гены кодируют функциональные антитела. Однако основным недостатком является то, что разнообразие последовательностей ограниче-

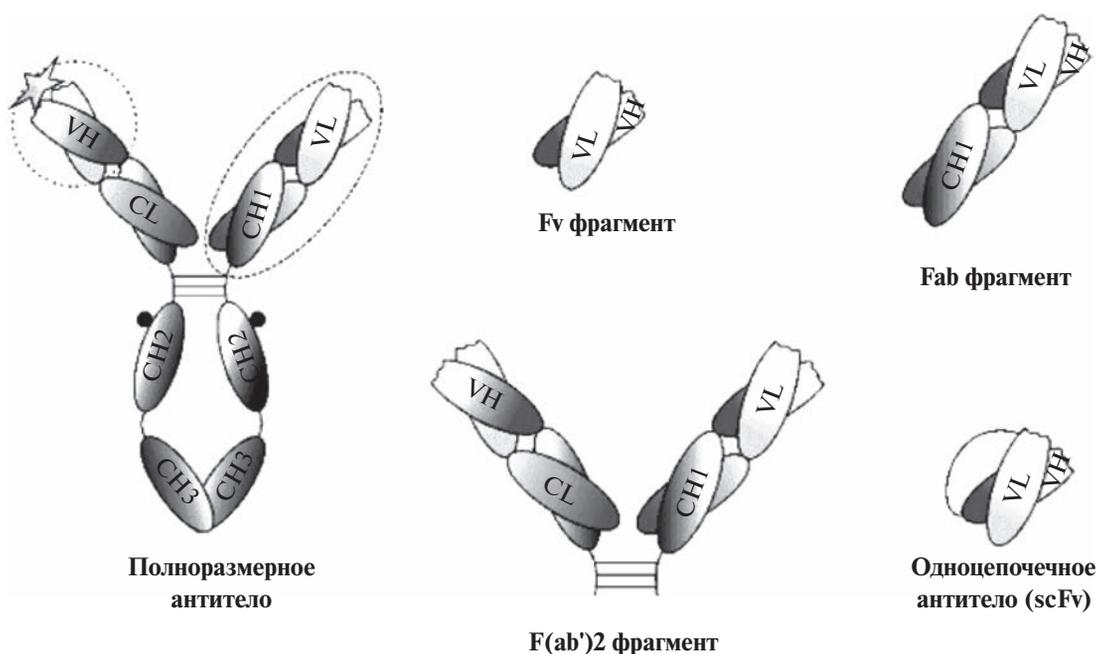


Рис. 2. Природный иммуноглобулин класса G и антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулина [49].

но охватом естественной иммунной системы, в которой существует определенная неравномерность использования тех или иных последовательностей. Также фрагменты из природных библиотек сильно отличаются по качеству и непредсказуемы по составу; многие из них могут оказаться недостаточно стабильными или неподходящими по другим причинам. Репертуар естественных библиотек составляет 10^7 – 10^{11} фрагментов.

При работе с фаговыми библиотеками антител возникают технические неудобства. Например, для амплификации библиотеки размером 10^{10} клонов требуется объем культуры в несколько десятков литров. Это во многом объясняет современную тенденцию предпочтения библиотек меньшего размера и узконаправленных репертуаров, полученных от иммунизированных доноров. Иммунные библиотеки обладают двумя основными характеристиками: они обогащены антиген-специфичными антителами, и аффинность некоторых из этих антител уже имеет высокий уровень, как следствие развития иммунного ответа. Таким образом, большую представленность в библиотеке имеют клоны, продуцирующие высокоаффинные антитела к антигену, использованному для иммунизации, появляющиеся в результате вторичного иммунного ответа на антиген. Поскольку представленность каждого семейства V-генов в популяции молекул определяет размер библиотеки и число клонов, необходимых для анализа, то в случае библиотек от иммунизированных животных достаточно получить около 10^6 независимых

рекомбинантов, чтобы среди них нашлись продуценты антител, специфично связывающих использованный для иммунизации антиген. Тогда как библиотеки, сконструированные на основе генетического материала лимфоцитов неиммунных доноров, должны содержать, по крайней мере, 10^8 индивидуальных клонов для воссоздания исходного разнообразия детерминант антител [57, 58].

Конструирование синтетических библиотек основано на замене природных определяющих комплементарность областей (CDR) на набор случайных последовательностей, что позволяет создавать огромное разнообразие антигенсвязывающих сайтов. Использование синтетических и полусинтетических библиотек обусловлено их большей представленностью, чем натуральных, однако создание таких библиотек является более трудоемким процессом, сопряженным с определенными ограничениями, которые приходится учитывать. Например, введение полностью синтетических участков CDR может привести к неправильному сворачиванию и агрегации белка [59]. Потребовалось время для отработки подходов к определению того, какие CDR лучше использовать. Репертуар синтетических библиотек, как правило, доходит до 10^9 – 10^{11} фрагментов.

В целом, наивные и синтетические библиотеки более универсальны, так как обладают большим репертуаром. Вместе с тем, иммунные библиотеки обогащены антиген-специфичными высокоаффинными антителами. Поэтому выбор типа библиотеки зависит от характера поставленной задачи.

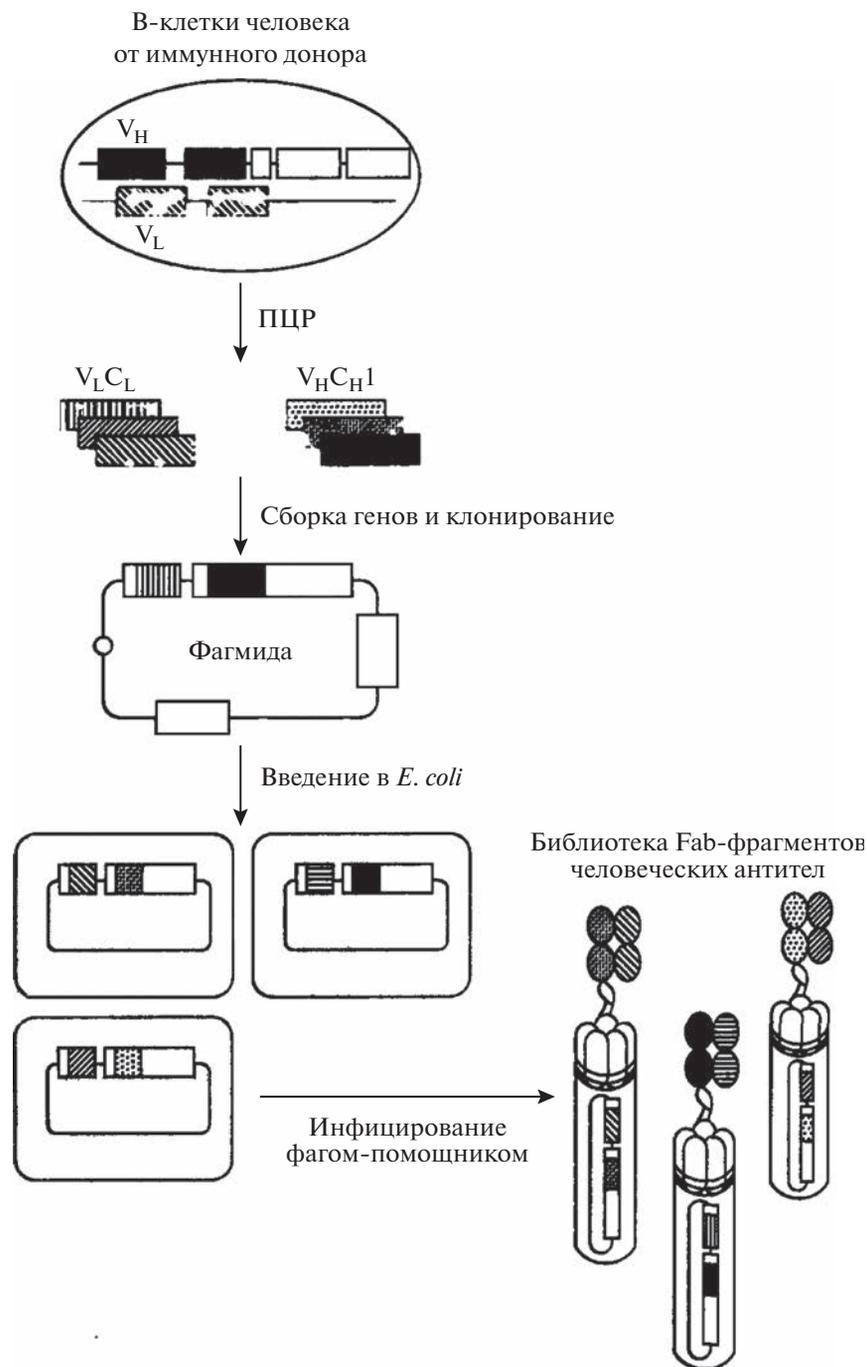


Рис. 3. Схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки [56].

На сегодняшний день разрабатываются методы оценки качества фаговой библиотеки, главным образом, ее представленности и разнообразия. Обычно ее определяют методом “отпечатков пальцев” ДНК, либо секвенирования нескольких сотен случайных библиотечных элементов. Однако вывод о разнообразии из такой небольшой выборки является очень поверхностным и дает огра-

ниченную информацию о реальном состоянии библиотеки. Недавно был предложен метод секвенирования нового поколения Next generation sequencing (NGS). Однако еще многое предстоит сделать, чтобы полностью использовать потенциал NGS для количественного анализа репертуаров антител и преодолеть существующие ограничения [55, 60–63].

ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ

Фаговые антитела являются весьма перспективным объектом для применения в качестве биорецепторов. Как отмечалось ранее, сама технология получения фаговых антител отличается быстротой и меньшей трудоемкостью, чем гибридная технология, а сами фаговые антитела обладают рядом преимуществ перед природными аналогами:

- небольшой размер фрагментов антител обычно сопровождается уменьшением неспецифического связывания, часто вызываемым областью Fc интактного антитела;
- возможность более плотной иммобилизации фаговых антител в биосенсоре;
- в отличие от полноразмерных антител, фаговые антитела могут синтезироваться в бактериях, таких как *E. coli*, что значительно снижает стоимость производства, поскольку отсутствует необходимость в специализированном оборудовании для культивирования клеток гибридных клеточных линий [64].

Технология фагового дисплея, созданная Д.П. Смитом [22, 65, 66] основана на упрощенных процедурах манипулирования с ДНК и бактериями, что значительно сокращает время получения и стоимость стабильных клонов [67, 68]. Данные преимущества обуславливают перспективы применения фаговых антител в биосенсорах и биочипах, в том числе для детекции патогенных бактерий, вирусов и эукариотических патогенов [58, 69, 70].

На сегодняшний день актуален вопрос мониторинга патогенных микроорганизмов, которые распространены повсеместно и представляют значительный риск для здоровья человека и животных, а также могут серьезно снижать качество сельскохозяйственной продукции. Следовательно, мониторинг этих микроорганизмов имеет первостепенное значение для профилактики внутрибольничных инфекций, поддержания здоровья населения в целом и для обеспечения соблюдения законодательных норм и стандартов качества. Быстрое обнаружение и идентификация патогена необходимы в случае анализа образцов пищевых продуктов с коротким сроком хранения или при внедрении подходящего противомикробного препарата для лечения потенциально опасной инфекции [71–73].

Примеры использования фаговых антител в составе биосенсорных датчиков для определения патогенов представлены в табл. 1. В частности, был разработан биосенсор для детекции *Salmonella typhimurium* и спор *Bacillus anthracis* на основе нескольких магнитоупругих датчиков, объединенных в одну систему. Причина выбора двух разных видов бактерий заключалась в том, чтобы продемонстрировать возможность магнитоупругих биосенсоров со специфичными фаговыми ан-

тителами одновременно определять и различать патогены, как представлено на рис. 4 [76]. В данной работе были сконструированы векторы на основе нитчатых фагов E2 (специфичных к *S. typhimurium*) и JRB7 (специфичных к спорам *B. anthracis*). Данная система показала, что высокоспецифичные фаговые антитела связывали соответствующие антигены, причем неспецифическое связывание исключалось обработкой раствором бычьего сывороточного альбумина. Подобные датчики показали хорошую устойчивость к внешним факторам в системе с проточной жидкостью, о чем свидетельствует отсутствие коррозии; пределы обнаружения датчиков оценивались в 5×10^3 КОЕ/мл, а насыщение происходило при более чем 5×10^8 КОЕ/мл. Таким образом, данный подход предполагает возможность анализировать объект на наличие сразу нескольких видов микроорганизмов, что удобно при исследовании пищевых объектов, которые обсеменены посторонней микрофлорой. Этот метод имеет значительные преимущества в мониторинге больших объемов пищевых продуктов на наличие небольшого количества биологических патогенов или загрязняющих веществ [76]. Отметим при этом, что нормативные требования к содержанию патогенов в пищевых продуктах намного ниже, и сенсор с таким пределом обнаружения может применяться лишь в сочетании с предварительными действиями по концентрированию и/или доращиванию.

Возможность определения бактерий *Listeria monocytogenes* с помощью фаговых антител и датчиков на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (SPR) показана в работе [80]. Действие данных датчиков является быстрым и позволяет осуществлять прямое обнаружение целевых объектов. Авторами была подобрана концентрация фаговых антител, обеспечивающая наиболее эффективную адсорбцию к поверхности биосенсора, что значительно сократило время на их иммобилизацию. Данные эксперимента указывают на высокую специфичность фаговых антител, при этом биосенсор обеспечивает расчетный предел обнаружения 2×10^6 КОЕ/мл для целых клеток *L. monocytogenes* [80]. Другим коллективом авторов показана перспективность применения фаговых антител для дифференциации бактерий *L. monocytogenes*, *E. coli* и *Campylobacter jejuni* [84, 85].

Для идентификации клеток *Legionella pneumophila* с помощью фаговых антител был разработан электрохимический VR2 сенсор (Vantix) [79]. Пара антител scFv-Fc была интегрирована в биосенсор, демонстрируя специфическое и быстрое обнаружение *L. pneumophila* на портативном устройстве. С помощью этой системы в течение 35 мин было обнаружено около 10000 клеток бактерий.

Таблица 1. Примеры биосенсорных систем с использованием рекомбинантных антител в качестве рецепторного элемента для определения бактерий

Тип сенсорной системы	Формат фаговых антител	Бактерия	Мишень	Предел детекции	Время анализа	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7
Электрооптический и акустический датчики	scFv	<i>Azospirillum brasilense</i>	Клетки бактерий, флагеллин, ЛПС	10 ³ клеток/мл	10 мин	[39, 74, 75]
Магнитоупругий биосенсор на основе нескольких типов фагов	—*	<i>Bacillus anthracis</i>	Споры	5 × 10 ³ КОЕ/мл	15–20 мин	[76]
		<i>Salmonella typhimurium</i>	Клетки бактерий			
Электрооптический датчик	scFv	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Экзополисахарид, капсульный полисахарид, ЛПС	—*	5 мин	[77, 78]
Электрохимический сенсор VR2 (Vantix)	scFv-Fc	<i>Legionella pneumophila</i>	Целые клетки	10 ⁴ клеток	35 мин	[79]
Сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR)	scFv	<i>Listeria monocytogenes</i>	Белок, индуцирующий полимеризацию актина (ActA)	2 × 10 ⁶ КОЕ/мл	2 ч	[80]
Колориметрический биосенсор с наночастицами золота и фаговыми антителами	—*	<i>Staphylococcus aureus</i>	Клетки бактерий	19 КОЕ/мл	30 мин	[81]
Датчик на основе поверхностно-усиленного рамановского рассеяния (SERS)	—*			10 КОЕ/мл	—*	[82]
Система детекции с использованием рамановской спектроскопии	—*	<i>Staphylococcus aureus</i>	Клетки бактерий	10 КОЕ/7 мл	6 ч	[83]
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
		<i>Escherichia coli</i>				

* — информация не указана.

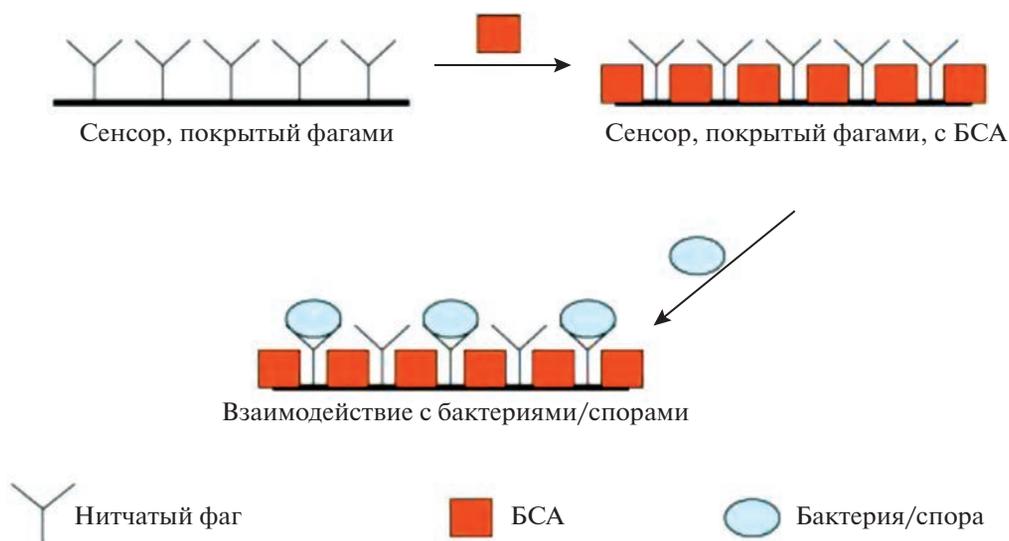


Рис. 4. Принцип использования фаговых антител для обнаружения патогенов при помощи нескольких магнитоупругих датчиков 74 с изменениями.

Колориметрический биосенсор с использованием наночастиц золота и фаговых антител был разработан для быстрой, специфичной и чувствительной идентификации *Staphylococcus aureus* в клинических образцах [81]. Также для быстрой и чувствительной диагностики стафилококковой инфекции с использованием фаговых частиц был разработан метод на основе спектроскопии поверхностно-усиленного рамановского рассеяния (SERS) [82]. Кроме того, предложенный SERS-зонд проявлял бактерицидные свойства в отношении *S. aureus*, что показывает многообещающий потенциал его использования в качестве многофункциональной платформы для одновременного обнаружения и инактивации данного патогена.

Липополисахариды (ЛПС), локализованные на поверхности внешней мембраны грамотрицательных бактерий в значительной степени определяют антигенные и поверхностные свойства микроорганизмов [86–89], а также участвуют в процессах адгезии, механизмах узнавания чужеродных объектов и индукции защитных реакций макропартнера. Данные по строению ЛПС являются основой для внутривидовой классификации бактерий. Были проведены эксперименты по отработке методики получения фаговых антител к микробным клеткам на примере ассоциативных почвенных бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245. Нарботанные фаговые антитела к клеткам азоспирилл использовали для определения ЛПС и флагеллина с применением иммунодота и методов электрооптического и акустического анализа клеточных суспензий [39, 74, 76]. Полученные данные позволили использовать технологию фагового дисплея для отбора антител, специфичных к ЛПС другого вида почвенных бактерий *Her-*

baspirillum seropedicae Z78, которые применяли для их селективного определения с помощью оптической платформы [77]. Также электрооптическим методом с применением фаговых антител к основным антигенам клеток *H. seropedicae* Z78 (экзополисахариды, капсульные полисахариды и ЛПС) проведена оценка их комплементарного взаимодействия в системе антиген-антитело. Выявленные закономерности изменения электрофизических параметров хорошо согласовывались с компонентным составом антигенов бактерий рода *Herbaspirillum*, их топографическим распределением, а также были подтверждены результатами электронной микроскопии и дот-анализа [78].

Особый интерес представляет применение фаговых антител для определения бактерий в иммуноаналитических системах, одной из которых является метод иммуноферментного анализа (ИФА). ИФА, являющийся классическим методом для детекции антигенов, характеризуется высокой чувствительностью детекции ферментативной метки (вплоть до 10^{-12} моль в образце и ниже) [90]. В связи с широкой востребованностью метода ИФА для определения бактерий в клинической практике важно оценить возможность применения фаговых антител в качестве селективного агента. Например, в работе [91] показана возможность применения фаговых антител против пяти различных антигенов *S. typhimurium* для определения данного патогена методом твердофазного ИФА. Также метод ИФА с применением фаговых антител (табл. 2) был использован для идентификации бактерий родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Chlamydophila*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Francisella*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Lepto-*

spira, Listeria, Moraxella, Mycobacterium, Neisseria, Porphyromonas, Pseudomonas, Ralstonia, Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio, Yersinia. В табл. 2 представлены тип фаговых библиотек и форматы фаговых антител при определении разных патогенов [92–95, 97–106, 108–116, 118, 119, 121–128].

Дот-блот иммуноанализ и иммунохроматографические тест-системы успешно объединяют максимальную простоту проведения определения и быстрое получение результатов. Дот-блот иммуноанализ основан на визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками) антител. Иммунохроматографический анализ основан на движении элюента вдоль мембраны (латеральная диффузия), приводящем к образованию специфических иммунных комплексов, которые визуализируются в виде цветных полос. Дот-блот иммуноанализ и иммунохроматографические тест-системы с использованием фаговых антител применяются для определения бактерий *Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningitidis, S. aureus, Streptococcus suis* и т.д. (табл. 2).

Развитие иммунологии и геномной инженерии привело к разработке новых методов получения антител, в том числе к созданию технологии фагового дисплея [129, 130]. Данная методика является предпочтительным выбором для производства рекомбинантных антител в большинстве лабораторий, поскольку обеспечивает быструю и экономичную наработку антител с использованием нитевидного фага.

Рекомбинантные антитела используются в диагностике благодаря их специфичности и аффинности. На сегодняшний день на рынке доступно множество платформ, таких как иммунохроматографический анализ, ИФА и микроскопическая визуализация клеток, которые позволяют быстро и точно идентифицировать антигены-мишени, обнаруженные в образце. Большинство платформ используют либо анализ захвата антигена, либо анализ захвата антител для диагностики определенных заболеваний [131].

Следует отметить, что годовой объем продаж терапевтических антител превысил 98 млрд долларов США в 2017 г., а прогноз на 2028 г. составляет более 450 млрд [132]. По данным Fortune Business Insights в 2021 г. соответствующий объем рынка составил 178.5 млрд долларов (<https://www.fortunebusinessinsights.com/monoclonal-antibody-therapy-market-102734>). Но при этом отсутствуют точные сведения об объеме применения рекомбинантных антител. На данный момент использование подобных антител в терапии и диагностике весьма ограниче-

но, и необходимо проводить дополнительные исследования в данном направлении.

Большой потенциал применения комбинаторных библиотек дает исследователям беспрецедентную возможность определения бактерий, игнорируя использование длительных диагностических процедур. Одним из важных моментов при развитии биосенсоров является подбор соответствующего сенсорного элемента. Технология фагового дисплея фрагментов антител является перспективным методом получения стабильных сенсорных элементов для их использования в датчиках.

Отметим основные преимущества использования фагового дисплея антител по сравнению с классическими методами получения антител:

– Производство рекомбинантных антител проводится *in vitro* и отсутствует необходимость проведения экспериментов с привлечением животных.

– Уменьшение времени, необходимого для продукции антител, поскольку классические методы требуют иммунизации, которая может занять несколько недель или месяцев, чтобы вызвать достаточный иммунный ответ для выработки антител.

– Фаговые антитела обладают высокой эффективностью в детекции необходимого анализа; имеют преимущества перед природными иммуноглобулинами и, в некоторых случаях, перед их растворимыми фрагментами.

– Технология получения фаговых антител нетрудоемкая, обладает низкой себестоимостью и достаточно быстрая, что позволяет за короткий срок посредством саморепликации фагов получать репертуар фрагментов антител, существующих в организме, и даже расширять этот репертуар посредством искусственного синтеза.

– Возможность создания гибридных молекул с маркерными белками (например, с tag-пептидом), что позволяет эффективно выявлять иммунохимическую реакцию.

– С появлением технологии фагового дисплея стало возможным получение антител к аутоантигенам, слабоиммуногенным соединениям (гаптенам) и токсинам.

Однако следует признать, что фаговые антитела имеют более низкую аффинность по сравнению с обычными иммуноглобулинами. Это связано с отсутствием созревания аффинности антител фагового происхождения, тогда как антитела животного происхождения продуцируются после процесса созревания. В связи с этим, было предложено ввести дополнительную стадию созревания аффинности для улучшения свойств фаговых антител [129].

Производство антител с помощью рекомбинантных методов сможет повысить скорость их наработки, избегая серьезных затрат. В силу сво-

Таблица 2. Рекомбинантные антитела к патогенным бактериям, полученные с помощью технологии фагового дисплея [58, с изменениями и дополнениями]

Бактерия	Мишень фаговых антител	Тип фаговой библиотеки	Формат фаговых антител	Применение фаговых антител	Ссылка
1	2	3	4	5	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Белок клеточной поверхности Вар	Иммунная	VНН	ИФА, вестерн-блоттинг, <i>in vivo</i> нейтрализация	[92]
<i>Bacillus anthracis</i>	Защитный антиген РА	Наивная	scFv	ИФА, <i>in vitro</i> ингибирование	[93]
<i>Bordetella pertussis</i>	Филаментный гемагглютинин, пертактин	Иммунная	scFv	ИФА, <i>in vitro</i> ингибирование, <i>in vivo</i> исследования	[94]
<i>Brucella melitensis</i>	Облученные бактерии	Иммунная	scFv	ИФА	[95]
<i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Целые бактериальные клетки, убитые нагреванием	Наивная	scFv	—*	[96]
<i>Chlamydophila psittaci</i>	2,4 [2, 8]2,4-связанный Кдо тетрасахарид	Иммунная	scFv	ИФА, иммунофлуоресценция	[97]
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Клетки бактерий	Наивная	scFv	ИФА, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция	[98]
<i>Clostridium difficile</i>	Протеины клеточной поверхности, включая FliC и FliD	Полусинтетическая	scFv	ИФА, вестерн-блоттинг, пробы подвижности <i>in vitro</i>	[99]
<i>Clostridium perfringens</i>	Эпсилон-токсин ETX	Синтетическая	scFv, VH	ИФА	[100]
<i>Escherichia coli</i>	Живые клетки бактерий	Иммунная	VНН	ИФА	[101]
<i>Francisella tularensis</i>	ЛПС	Иммунная	scFv, IgG	ИФА, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция, <i>in vitro</i> нейтрализация	[102]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—*	Наивная	scFv, scFv-Fc, IgG	ИФА, иммунофлуоресценция, тесты <i>in vivo</i>	[103]
<i>Haemophilus influenzae</i>	Капсульный полисахарид	Иммунная	Fab	ИФА	[104]
<i>Helicobacter pylori</i>	Уреаза	Полусинтетическая	scFv	ИФА, вестерн-блоттинг	[105]
	Вакуолизирующий цитотоксин А VacA	Полусинтетическая	scFv	ИФА, электрофорез, вестерн-блоттинг, SPR-диагностика, проточная цитофлуориметрия, молекулярное моделирование	[106]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Белок S-слоя	Наивная	scFv	Определение клеток, активируемых флуоресценцией, вестерн-блоттинг	[107]

Таблица 2. Продолжение

Бактерия	Мишень фаговых антител	Тип фаговой библиотеки	Формат фаговых антител	Применение фаговых антител	Ссылка
1	2	3	4	5	6
<i>Leptospira</i> spec.	Белок внешней мембраны LipL21	Наивная	scFv	ИФА	[108]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Целые клетки	Синтетическая	scFv	ИФА, вестерн-блоттинг, иммунологическая детекция	[84]
	Пируватдегидрогеназный комплекс-фермент 2 PDC-E2	Наивная	scFv, scFv-Fc	ИФА, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция	[109]
	Интерналины A (InlA) и B (InlB)	Наивная	scFv-Fc	ИФА	[110]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Клетки, убитые нагреванием	Наивная	VНН	ИФА, вестерн-блоттинг	[111]
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Высокомолекулярный белок наружной мембраны НМВ-OMP	Полусинтетическая	scFv	ИФА, определение клеток, активируемых флуоресценцией, вестерн-блоттинг, <i>in vitro</i> ингибирование	[112]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Антиген 85B	Наивная	scFv, scFv-Fc	ИФА, вестерн-блоттинг	[113]
	Липоарабиноманнан LAM	Иммунная	scFv	ИФА	[114]
	Липоарабиноманнан LAM	Иммунная	scFvIgG	ИФА, вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, проточная цитометрия	[115]
<i>Neisseria</i> , 4 strains	Бациллозамин	—*	scFv	ИФА, иммунофлуоресцентное окрашивание и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия	[116]
<i>Neisseria meningitidis</i>	Адгезин NadA	Иммунная	VНН	Дот-блоттинг, вестерн-блоттинг, иммуногистохимия, тесты <i>in vitro</i>	[117]
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Гингипаин RgpB	Наивная	VНН	ИФА	[118]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ЛПС	Иммунная	Fab	ИФА, иммунофлуоресцентный анализ	[119]
	Кэпирующий белок жгутика FliD	Наивная	scFv, scFv-Fc	Вестерн-блоттинг	[120]
	Белок, связывающий спермидин SpuE	Наивная	scFv	ИФА	[121]

Таблица 2. Окончание

Бактерия	Мишень фаговых антител	Тип фаговой библиотеки	Формат фаговых антител	Применение фаговых антител	Ссылка
1	2	3	4	5	6
<i>Ralstonia solanacearum</i>	ЛПС	Наивная	scFv	ИФА, иммунофлуоресценция, вестерн-блоттинг	[122]
<i>Salmonella typhimurium</i>	5 различных иммуногенных белков	Наивная	scFv	ИФА	[91]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Клетки бактерий	Иммунная	scFvscFv-Fc	ИФА, дот-блоттинг	[123]
	Энтеротоксин В стафилококков SEB	Иммунная	VНН	ИФА, электрофорез, вестерн-блоттинг	[124]
<i>Streptococcus suis</i>	Клетки бактерий, экстраклеточный фактор EF	Полусинтетическая	scFv	ИФА, вестерн-блоттинг, дот-блоттинг	[125]
<i>Vibrio cholerae</i>	ЛПС	Иммунная	VНН	ИФА, тесты <i>in vivo</i>	[126]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Белок наружной мембраны OmpU	Полусинтетическая	sdAb	ИФА, <i>in vitro</i> ингибирование	[127]
<i>Yersinia pestis</i>	Капсулоподобный антиген F1	Наивная	scFv	ИФА	[128]

* Информация не указана.

ей “гибкости” в отношении модификаций рекомбинантные антитела возможно адаптировать с применением новых технологий и механизмов для последующих применений в диагностике. Оптимизация процедуры получения фаговых антител и варьирование их свойств позволит повысить эффективность использования данных антител в биосенсорных системах, которые незаменимы практически в любой отрасли медицины, биотехнологии, экологии, пищевой промышленности и др.

Таким образом, рекомбинантные антитела, полученные с помощью фагового дисплея, обеспечивают важную платформу для детекции бактерий, и могут быть задействованы в медицине и ветеринарии для быстрого и точного обнаружения патогенов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-24-00417.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gascoyne P., Pethig R., Satayavivad J., Becker F.F., Ruchirawat M. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1323. P. 240–252.
2. Uithoven K.A., Schmidt J.C., Ballman M.E. // Biosens. Bioelectron. 2000. V. 14. № 10–11. P. 761–770.
3. Vaughan P.S., Leszyk J.D., Vaughan K.T. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 28. P. 26171–26179.
4. Lesniewski A., Los M., Jonsson–Niedziółka M., Krajewska A., Szot K., Los J.M., Niedziółka–Jonsson J. // Bioconjug. Chem. 2014. V. 25. № 4. P. 644–648.
5. Spadiut O., Capone S., Krainer F., Glieder A., Herwig C. // Trends Biotechnol. 2014. V. 32. № 1. P. 54–60.
6. Патнер Г.М. Поликлональные антитела как реагенты для иммуноанализа: получение, характеристика, применение. Автореф. дис. д-ра мед. наук. Томск, 1996. 47 с.
7. Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Камруха А.Г. // Успехи биологической химии. 2010. Т. 50. С. 203–258.
8. Flajnik M.F., Singh N.J., Holland S.M. Paul’s Fundamental Immunology / 8 Ed. Amsterdam: Wolters Kluwer Health, 2022. 1312 p.
9. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Перевод с англ. М.: Мир, 2002. 589 с.
10. Петрова Е.Э., Комалева Р.Л., Лахтина О.Е., Самохвалова Л.В., Калинина Н.А., Шошина Н.С. et al. // Биорганическая химия. 2009. Т. 35. № 3. С. 357–368.

11. Казачинская Е.И., Иванова А.В., Сорокин А.В., Качко А.В., Субботина Е.Л., Разумов И.А., Локтев В.Б. // Медицинская иммунология. 2010. Т. 12. № 3. С. 177–190.
12. Bradbury A.R., Marks J.D. // J. Immunol. Methods. 2004. V. 290. № 1–2. P. 29–49.
13. Bradbury A.R.M., Sidhu S., Dübel S., McCafferty J. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. № 3. P. 245–254.
14. Деев С.М., Лебедево Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Курпичников М.П. // Успехи химии. 2015. Т. 84. № 1. С. 1–26.
15. Miller L.E., Stevens C.D. Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective. 5 Ed. Philadelphia: F.A. Davis, 2020. 624 p.
16. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 10 Ed. Amsterdam: Elsevier, 2021. 600 p.
17. Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Kaplun A.P., Dzantiev B.B. // Mol. Immunol. 2002. V. 39. № 7–8. P. 413–422.
18. Schroeder H.W. Jr, Cavacini L. // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. V. 125. № 2. Suppl 2. P. S41–52.
19. Duquesnoy R.J. // Hum. Immunol. 2006. V. 67. № 11. P. 847–862.
20. Chi S.W., Maeng C.Y., Kim S.J., Oh M.S., Ryu C.J., Kim S.J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 22. P. 9230–9235.
21. Sundberg E.J. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 524. P. 23–36.
22. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // Nature. 1990. V. 348. № 6301. P. 552–554.
23. Sidhu S.S., Geyer C.R. Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery / 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press, 2015. 584 p.
24. Kehoe J.W., Kay B.K. // Chem. Rev. 2005. V. 105. № 11. P. 4056–4072.
25. Hammers C.M., Stanley J.R. // J. Invest. Dermatol. 2014. V. 134. № 2. P. 1–5.
26. Hoffman J.A., Giraudo E., Singh M., Zhang L., Inoue M., Porkka K., Hanahan D., Ruoslahti E. // Cancer Cell. 2003. V. 4. № 5. P. 383–391.
27. Joyce J.A., Laakkonen P., Bernasconi M., Bergers G., Ruoslahti E., Hanahan D. // Cancer Cell. 2003. V. 4. № 5. P. 393–403.
28. Zurita A.J., Arap W., Pasqualini R. // J. Control. Release. 2003. V. 91. № 1–2. P. 183–186.
29. Valadon P., Garnett J.D., Testa J.E., Bauerle M., Oh P., Schnitzer J.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 2. P. 407–412.
30. Frank R., Hargreaves R. // Nat. Rev. Drug Discov. 2003. V. 2. № 7. P. 566–580.
31. Rudin M., Weissleder R. // Nat. Rev. Drug Discov. 2003. V. 2. № 2. P. 123–131.
32. Ladner R.C., Sato A.K., Gorzelany J., de Souza M. // Drug Discov. Today. 2004. V. 9. № 12. P. 525–529.
33. Perez J.M., Josephson L., O'Loughlin T., Högemann D., Weissleder R. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. № 8. P. 816–820.
34. Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 20. P. 12617–12621.
35. Mikawa M., Wang H., Guo L., Liu R., Marik J., Takada Y., Lam K., Lau D. // Mol. Cancer Ther. 2004. V. 3. № 10. P. 1329–1334.
36. Kelly K.A., Allport J.R., Tsourkas A., Shinde–Patil V.R., Josephson L., Weissleder R. // Circ. Res. 2005. V. 96. № 3. P. 327–336.
37. Zitzmann S., Mier W., Schad A., Kinscherf R., Askoxylakis V., Krämer S. et al. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 1. P. 139–146.
38. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Бородина И.А., Фомин А.С., Староверов С.А., Дыкман Л.А., Шихабудинов А.М. // Биофизика. 2017. Т. 62. № 3. С. 472–484.
39. 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.
40. Deantonio C., Cotella D., Macor P., Santoro C., Sblattero D. // Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. 2014. P. 277–295.
41. Lo B.K.C. Antibody Engineering. Methods and Protocols. V. 248. Totowa, N.J.: Humana Press, 2004. 562 p.
42. McConnell S.J., Dinh T., Le M.H., Spinella D.G. // Biotechniques. 1999. V. 26. P. 208–210.
43. Сумарока М.В., Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Зайцева И.С., Соколов О.И., Щеголев С.Ю., Харрис У. // Аллергология и иммунология. 2000. Т. 1. № 2. С. 134–135.
44. Krebber A., Bornhauser S., Burmester J., Honegger A., Willuda J., Bosshard H.R., Plückerthun A. // J. Immunol. Methods. 1997. V. 201. № 1. P. 35–55.
45. Hoogenboom H.R., Chames P. // Immunol. Today. 2000. V. 21. № 8. P. 371–378.
46. Staroverov S.A., Volkov A.A., Fomin A.S., Laskavuy V.N., Mezhenyuy P.V., Kozlov S.V. et al. // J. Immunoassay Immunochem. 2015. V. 36. № 1. P. 100–110.
47. Тукунова Н.В., Морозова В.В. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 3. С. 22–31.
48. Ahmad Z.A., Yeap S.K., Ali A.M., Ho W.Y., Alitheen N.B.M., Hamid M. // Clin. Dev. Immunol. 2012. V. 2012. Article 980250. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
49. Dormeshkin D.O., Brichko E.A., Gilep A.A., Usanov S.A. // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series. 2017. № 2. P. 93–110.
50. Anderson G.P., Liu J.L., Hale M.L., Bernstein R.D., Moore M., Swain M.D., Goldman E.R. // Anal. Chem. 2008. V. 80. № 24. P. 9604–9611.
51. Шаталова А.В., Якубова А.С., Палимпсестов В.В., Есмагамбетов И.Б. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019. Т. 8. № 1. С. 14–22.
52. Goldman E.R., Liu J.L., Bernstein R.D., Swain M.D., Mitchell S.Q., Anderson G.P. // Sensors. 2009. V. 9. № 1. P. 542–555.
53. Тиллиб С.В. // Мол. биология. 2011. Т. 45. № 1. С. 77–85.
54. Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J., Harris W.J. // J. Immunol. 2000. V. 164. № 12. P. 6221–6229.

55. *Bashir S., Paeshuyse J.* // *Antibodies*. 2020. V. 9. № 2. Article 21.
<https://doi.org/10.3390/antib9020021>
56. *Шелкунов С.Н.* Генетическая инженерия: Учебно-справочное пособие. 2 Изд. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. 496 с.
57. *Gavilondo J.V., Larrick J.W.* // *Biotechniques*. 2000. V. 29. № 1. P. 128–132.
58. *Roth K.D.R., Wenzel E.V., Ruschig M., Steinke S., Langreder N., Heine P.A. et al.* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. Article 697876.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.697876>
59. *de Kruif J., Boel E., Logtenberg T.* // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. № 1. P. 97–105.
60. *Аникаев А.Ю., Ломоносов А.М.* // *Лабораторная служба*. 2014. Т. 3. № 1. С. 32–36.
61. *Collins F.S., Hamburg M.A.* // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 369. № 25. P. 2369–2371.
62. *Fantini M., Pandolfini L., Lisi S., Chirichella M., Arisi I., Terrigno M., Goracci M., Cremisi F., Cattaneo A.* // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. Article e0177574.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177574>
63. *Braun R., Schönberger N., Vinke S., Lederer F., Kalinowski J., Pollmann K.* // *Viruses*. 2020. V. 12. № 12. Article 1360.
<https://doi.org/10.3390/v12121360>
64. *Peltomaa R., Benito-Peña E., Barderas R., Moreno-Bondi M.C.* // *ACS Omega*. 2019. V. 4. № 7. P. 11569–11580.
65. *Smith G.P.* // *Science*. 1985. V. 228. № 4705. P. 1315–1317.
66. *Smith G.P., Petrenko V.A.* // *Chem. Rev.* 1997. V. 97. № 2. P. 391–410.
67. *Chassagne S., Laffly E., Drouet E., Hérodin F., Lefranc M.P., Thullier P.* // *Mol. Immunol.* 2004. V. 41. № 5. P. 539–546.
68. *Jacobsson K., Rosander A., Bjerketorp J., Frykberg L.* // *Biol. Proced. Online*. 2003. V. 5. P. 123–135.
69. *Stich N., Gandhum A., Matyushin V., Raats J., Mayer C., Alguel Y., Schalkhammer T.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2002. V. 2. № 3–4. P. 375–381.
70. *Rudenko N., Fursova K., Banada P.P., Bhunia A.K.* *Antibodies and Immunoassays for Detection of Bacterial Pathogens.* / Eds. M. Zourob, S. Elwary, A. Turner. N.Y.: Springer Science + Business Media, 2008. P. 567–602.
71. *Byrne B., Stack E., Gilmartin N., O’Kennedy R.* // *Sensors*. 2009. V. 9. № 6. P. 4407–4445.
72. *Walper S.A., Lasarte Aragonés G., Sapsford K.E., Brown III C.W., Rowland C.E., Breger J.C., Medintz I.L.* // *ACS Sens.* 2018. V. 3. № 10. P. 1894–2024.
73. *Rudenko N., Fursova K., Shepelyakovskaya A., Karatovskaya A., Brovko F.* // *Sensors*. 2021. V. 21. № 22. Article 7614.
<https://doi.org/10.3390/s21227614>
74. *Dykman L.A., Staroverov S.A., Guliy O.I., Ignatov O.V., Fomin A.S., Vidyasheva I.V. et al.* // *J. Immunoassay Immunochem.* 2012. V. 33. № 2. P. 115–127.
75. *Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Караваева О.А., Дыкман Л.А., Староверов С.А., Игнатов О.В.* // *Биофизика*. 2012. Т. 57. № 3. С. 460–467.
76. *Huang S., Yang H., Lakshmanan R.S., Johnson M.L., Wan J., Chen I.-H. et al.* // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. № 6. P. 1730–1736.
77. *Guliy O.I., Velichko N.S., Fedonenko Yu.P., Bunin V.D.* // *Talanta*. 2019. V. 202. P. 362–368.
78. *Гулий О.И., Величко Н.С., Федоненко Ю.П., Бунин В.Д.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. № 1. С. 96–104.
79. *Kuhn P., Thiem S., Steinert M., Purvis D., Lugmayr V., Treutlein U. et al.* // *Hum. Antibodies*. 2017. V. 26. № 1. P. 29–38.
80. *Nanduri V., Bhunia A.K., Tu S.I., Paoli G.C., Brewster J.D.* // *Biosens. Bioelectron.* 2007. V. 23. № 2. P. 248–252.
81. *Liu P., Han L., Wang F., Petrenko V.A., Liu A.* // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 82. P. 195–203.
82. *Wang X.-Y., Yang J.-Y., Wang Y.-T., Zhang H.-C., Chen M.-L., Yang T., Wang J.-H.* // *Talanta*. 2021. V. 221.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121668>
83. *De Plano L.M., Fazio E., Rizzo M.G., Franco D., Cannazza S., Trusso S., Neri F., Guglielmino S.P.P.* // *J. Immunol. Methods*. 2019. V. 465. P. 45–52.
84. *Paoli G.C., Brewster J.D.* // *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 2007. V. 15. P. 77–91.
85. *McIvor M.J., Karoonuthaisiri N., Charlermroj R., Stewart L.D., Elliott C.T., Grant I.R.* // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 9. Article e74312.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074312>
86. *Holst O., Ulmer, A.J., Brade H., Flad H.-D., Rietschel E.T.* // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996. V. 16. № 2. P. 83–104.
87. *Saunders N.J., Peden J.F., Hood D.W., Moxon E.R.* // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27. № 6. P. 1091–1098.
88. *Kannenberg E.L., Carlson R.W.* // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 39. № 2. P. 379–391.
89. *Mora L., Newton W.E.* *Isolation, Identification and localization of Diazotrophic Bacteria from C4-plant Miscanthus.* / Ed. B. Eckert. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2008. 705 p.
90. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* *Теория и практика иммуноферментного анализа.* М.: Изд-во “Высшая школа”, 1991. С. 3–42.
91. *Meyer T., Schirrmann T., Frenzel A., Mieth S., Stratmann-Selke J., Gerlach G.F. et al.* // *BMC Biotechnol.* 2012. V. 12. Article 29.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-29>
92. *Payandeh Z., Rasooli I., Mousavi Gargari S.L., Rajabi Bazl M., Ebrahimizadeh W.* // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2014. V. 108. № 2. P. 92–98.
93. *Ahn B.E., Bae H.W., Lee H.R., Woo S.J., Park O.K., Jeon J.H., Park J., Rhie G.E.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 509. № 2. P. 611–616.
94. *Hussein A.H., Davis E.M., Halperin S.A., Lee S.F.* // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 11. P. 5476–5482.

95. *Hayhurst A., Happe S., Mabry R., Koch Z., Iverson B.L., Georgiou G.* // *J. Immunol. Methods*. 2003. V. 276. № 1–2. P. 185–196.
96. *Zou N., Newsome T., Li B., Tsai S., Lo S.-C.* // *Exp. Biol. Med.* 2007. V. 232. № 4. P. 550–556.
97. *Gerstenbruch S., Brooks C.L., Kosma P., Brade L., Mackenzie C.R., Evans S.V., Brade H., Müller–Loennies S.* // *Glycobiology*. 2010. V. 20. № 4. P. 461–472.
98. *Lindquist E.A., Marks J.D., Kleba B.J., Stephens R.S.* // *Microbiology*. 2002. V. 148. № 2. P. 443–451.
99. *Shirvan A.N., Aitken R.* // *Braz. J. Microbiol.* 2016. V. 47. № 2. P. 394–402.
100. *Alibeiki M., Golchin M., Tabatabaei M.* // *BMC Vet. Res.* 2020. V. 16. № 1. Article 361. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02572-4>
101. *Salhi I., Bessalah S., Snoun D., Khorchani T., Hammad M.* // *Iran. J. Biotechnol.* 2020. V. 18. № 1. Article e2247. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.127753.2247>
102. *Mechaly A., Elia U., Alcalay R., Cohen H., Epstein E., Cohen O., Mazor O.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. Article 11418. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47931-w>
103. *Wang Q., Chang C.S., Pennini M., Pelletier M., Rajan S., Zha J. et al.* // *J. Infect. Dis.* 2016. V. 213. № 11. P. 1800–1808.
104. *Reason D.C., Wagner T.C., Lucas A.H.* // *Infect. Immun.* 1997. V. 65. № 1. P. 261–266.
105. *Fouladi M., Sarhadi S., Tohidkia M., Fahimi F., Samadi N., Sadeghi J., Barar J., Omidi Y.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 8. P. 3407–3420.
106. *Fahimi F., Sarhaddi S., Fouladi M., Samadi N., Sadeghi J., Golchin A. et al.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 16. P. 6899–6913.
107. *Close D.W., Ferrara F., Dichosa A.E., Kumar S., Daughton A.R., Daligault H.E. et al.* // *BMC Microbiol.* 2013. V. 13. Article 270. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-270>
108. *Mohd Ali M.R., Sum J.S., Aminuddin Baki N.N., Choong Y.S., Nor Amdan N.A., Amran F., Lim T.S.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 168. P. 289–300.
109. *Moreira G.M.S.G., Köllner S.M.S., Helmsing S., Jänsch L., Meier A., Gronow S. et al.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. Article 15267. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72159-4>
110. *Moreira G.M.S.G., Gronow S., Dübel S., Mendonça M., Moreira Á.N., Conceição F.R., Hust M.* // *Front. Public Health.* 2022. V. 10. Article 712657. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.712657>
111. *Tu Z., Chen Q., Li Y., Xiong Y., Xu Y., Hu N., Tao Y.* // *Anal. Biochem.* 2016. V. 493. P. 1–7.
112. *Boel E., Bootsma H., de Kruijf J., Jansze M., Klingman K.L., van Dijk H., Logtenberg T.* // *Infect. Immun.* 1998. V. 66. № 1. P. 83–88.
113. *Fuchs M., Kämpfer S., Helmsing S., Spallek R., Oehlmann W., Prilop W. et al.* // *BMC Biotechnol.* 2014. V. 14. Article 68. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-68>
114. *Kawasaki M., Echiverri C., Raymond L., Cadena E., Reside E., Gler M.T. et al.* // *PLoS Med.* 2019. V. 16. № 4. Article e1002780. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002780>
115. *Yan Z.-H., Zhao B., Pang Y., Wang X.-J., Yi L., Wang H.-L., Yang B., Wie P.-J., Jia H.-Y., Li S.-P., Zhao Y.-L., Zhang H.-T.* // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2021. V. 54. № 3. P. 437–446.
116. *Liu C.-Y., Weng C.-C., Lin C.-H., Yang C.-Y., Mong K.-K.T., Li Y.-K.* // *Biotechnol. Lett.* 2017. V. 39. № 3. P. 407–413.
117. *Kulkarni A., Mochnáčová E., Majerova P., Čurlík J., Bhide K., Mertinková P., Bhide M.* // *Front. Mol. Biosci.* 2020. V. 7. Article 573281. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.573281>
118. *Skottrup P.D., Leonard P., Kaczmarek J.Z., Veillard F., Enghild J.J., O’Kennedy R. et al.* // *Anal. Biochem.* 2011. V. 415. № 2. P. 158–167.
119. *Tout N.L., Lam J.S.* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997. V. 4. № 2. P. 147–155.
120. *Postel S., Deredge D., Bonsor D.A., Yu X., Diederichs K., Helmsing S. et al.* // *Elife.* 2016. V. 5. Article e18857. <https://doi.org/10.7554/eLife.18857.001>
121. *Zhang Y., Sun X., Qian Y., Yi H., Song K., Zhu H. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. № 24. P. 4882–4896.
122. *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.
123. *Nian S., Wu T., Ye Y., Wang X., Xu W., Yuan Q.* // *BMC Immunol.* 2016. V. 17. № 1. Article 8. <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0146-z>
124. *Zanganeh S., Rouhani Nejad H., Mehrabadi J.F., Hosseini R., Shahi B., Tavassoli Z., Aramvash A.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019. V. 187. № 2. P. 493–505.
125. *de Greeff A., van Alphen L., Smith H.E.* // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. № 7. P. 3949–3955.
126. *Ebrahimizadeh W., Mousavi Gargari S., Rajabibazi M., Safae Ardekani L., Zare H., Bakherad H.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. № 10. P. 4457–4466.
127. *Yu J., Sun Z., Sun X., Sun X., Wei H., Jia W. et al.* // *Microb. Pathog.* 2020. V. 143. Article 104136. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104136>
128. *Lillo A.M., Ayriss J.E., Shou Y., Graves S.W., Bradbury A.R., Pavlik P.* // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. Article e27756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027756>
129. *Hust M., Meyer T., Voedisch B., Rülker T., Thie H., El-Ghezal A. et al.* // *J. Biotechnol.* 2011. V. 152. № 4. P. 159–170.
130. *Ch’ng A.C.W., Choong Y.S., Lim T.S.* Phage Display-Derived Antibodies: Application of Recombinant Antibodies for Diagnostics. / Ed. S.K. Saxena. London: IntechOpen Limited, 2016. P. 107–135.
131. *Beadle C., Long G.W., Weiss W.R., McElroy P.D., Maret S.M., Oloo A.J., Hoffman S.L.* // *Lancet.* 1994. V. 343. № 8897. P. 564–568.
132. *Grilo A.L., Mantalaris A.* // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 9–16.

The Use of Phage Antibodies for Microbial Cells Detection (Review)

O. I. Guliy^{a, *}, S. S. Evstigneeva^a, and L. A. Dykman^a

^a *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov 410049 Russia*

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

Phage antibody display technology has revolutionized the field of bacterial immunodetection. This technology allows the expression of an antibody fused to the coat protein of a filamentous bacteriophage. The use of phage display makes it possible to obtain high-affinity antibodies by passing the stage of animal immunization, reducing the time for obtaining stable antibody-producing clones from several months to several weeks, significantly reducing the cost of the process. These advantages make phage antibodies an important tool for bacterial detection. The paper presents a brief description of the technological methods for obtaining phage antibodies to microbial cells. The possibilities and prospects for using phage antibodies as a selective agent in analytical systems, including biosensors, are discussed.

Keywords: phage display technology, microbial cells, biosensors

УДК 577.1

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОГО ИНТЕРФЕРОНА ГАММА ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ *Escherichia coli* ПРИ СНИЖЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. Е. А. Волосникова^{1, *}, Т. И. Есина¹, Д. Н. Щербаков¹, Н. В. Волкова¹, Я. С. Гогина¹, Т. А. Терещенко¹, Е. Д. Даниленко¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

*e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.10.2022 г.

После доработки 30.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Сконструирован рекомбинантный штамм–продуцент интерферона гамма человека (ИФН- γ) *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ , обеспечивающий высокий уровень его экспрессии. Разработан способ получения растворимой формы рекомбинантного ИФН- γ , включающий наработку биомассы штамма-продуцента, содержащего целевой белок в количестве 32–37% от общего содержания клеточных белков, из которых 15–17% в растворимой форме, выделение и очистку белка. Процесс выделения и очистки включал стадии дезинтеграции, осветление лизата клеток, хроматографической очистки и диализа. Разработанный способ позволил получить из 1 г влажной биомассы до 5 мг препарата с чистотой не менее 95% и высокой специфической (противовирусной) активностью.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон гамма человека, штамм-продуцент, культивирование, хроматография, специфическая активность

DOI: 10.31857/S0555109923020174, **EDN:** LVLXPXU

Человеческий интерферон гамма (ИФН- γ) является белком-цитокином широкого спектра действия, участвующим в транскрипционном контроле значительного количества иммунологически релевантных генов. Около 350 клинических испытаний ИФН- γ как средства лечения различных заболеваний (туберкулез, онкологические заболевания и др.) продолжают в настоящее время либо уже завершены [1]. В связи с этим, не теряет актуальности задача разработки эффективной масштабируемой технологии получения этого рекомбинантного белка.

ИФН- γ кодируется предшественником гена IFNG “NCBI: NP_000610.2”, который состоит из 1240 пар нуклеотидов с 4 экзонами и расположен на хромосоме 12q24.1. Белок представляет собой симметричный гомодимерный гликопротеин, включающий 143 аминокислотных остатка с двумя сайтами гликозилирования. Предшественник нативного ИФН- γ состоит из 166 аминокислот за счет дополнительных 23 остатков секреторного сигнального пептида на N-конце. Молекулярная масса белка в биологически активной димерной форме составляет 38.8 кДа [2]. По литературным данным, молекулярная масса рекомбинантного ИФН- γ , продуцируемого *Escherichia coli*, состав-

ляет 17–18 кДа, он не гликозилирован, однако сохраняет при этом физиологическую активность [3].

Попытки получения ИФН- γ при помощи различных экспрессионных систем, как прокариотических, так и эукариотических (дрожжи, растительные клетки, клетки млекопитающих и насекомых) предпринимались неоднократно [2]. Последние имеют ряд преимуществ, в первую очередь, возможностью получения секреторного варианта. Однако бактериальные системы экспрессии, такие как *E. coli*, по-прежнему активно используются для получения ИФН- γ , что обусловлено простотой и дешевизной их культивирования [4]. В то же время известно, что высокий уровень экспрессии и отсутствие механизмов посттрансляционных модификаций у бактерий способны приводить к агрегации рекомбинантных белков в виде так называемых “телец включения” и, как следствие, снижению или утрате их биологической активности и иммуногенности [5]. Выделение и очистка целевого белка из телец включения, восстановление его биологической активности требуют дополнительных технологических стадий, включающих денатурацию белка (солюбилизацию в хаотропных растворителях) и последующую ренатурацию. Экспериментальные условия для обеих стадий

обычно специфичны для конкретного белка и не всегда позволяют обеспечить его удовлетворительно высокий выход и сохранение активности [6]. Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению процессов агрегации, солюбилизации и рефолдинга рекомбинантных белков, проблемы, связанные с получением биологически активных белков в клетках *E. coli*, во многом остаются нерешенными.

Одним из подходов к решению данной проблемы является конструирование штаммов-продуцентов, способных синтезировать целевой белок в растворимой форме.

Повышение растворимости рекомбинантных белков в бактериальном цитозоле может быть достигнуто благодаря его коэкспрессии с шаперонами и слиянию с повышающими растворимость белками или фрагментами белков. Наиболее часто используемыми тегами растворимости являются: глутатион-S-трансфераза, тиоредоксин, убиквитин, белок, связывающий мальтозу, малый убиквитинподобный модификатор (SUMO) и др.

Помимо этого, для предотвращения образования телец включения возможно изменение условий культивирования *E. coli*, в частности, снижение температуры до уровня субоптимальных значений. Ограничивающим моментом в данном случае, однако, является замедление роста бактериальной культуры и снижение выхода рекомбинантного белка [7].

Цель работы – конструирование штамма-продуцента рекомбинантного интерферона гамма человека и подбор оптимальных условий его культивирования для обеспечения продукции белка преимущественно в растворимой форме, а также разработка способа его выделения.

МЕТОДИКА

Конструирование экспрессионного вектора. В работе использовали нуклеотидную последовательность ИФН- γ человека (NP_000610.2). Кодонный состав последовательности гена оптимизировали для экспрессии в системе *E. coli* при помощи сервиса “Codon Optimisation Tool” (“Integrated DNA Technologies”, США). Синтез гена проводился ООО “ДНК-синтез” (Россия). Синтезированная нуклеотидная последовательность была встроена в экспрессионный вектор pET21a (“Novagen”, Германия) по уникальным сайтам рестрикции BamHI и HindIII, в результате чего был получен плазмидный вектор pET-IFN- γ .

Получение биомассы клеток, содержащих целевой белок. Рекомбинантный штамм *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ получали трансформацией компетентных клеток *E. coli* BL 21 (“Novagen”) рекомбинантной плазмидной ДНК pET-IFN- γ при помощи метода электропорации. Дальнейшее выращивание

рекомбинантных клонов проводили на LB-агаре с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C в течение 18–20 ч. Колонии, содержащие рекомбинантную плазмиду, смывали с агара LB-бульоном, добавляли глицерин до конечной концентрации 15%. Полученную суспензию разливали в криоприборки по 100 мкл и хранили при температуре –70°C.

Посевной материал рекомбинантного штамма получали засевом суспензии штамма-продуцента в колбы Эрленмейера, содержащие среду LB с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл, и дальнейшим инкубированием на термостатируемой качалке при температуре 37°C в течение 18–20 ч.

Посевной материал использовали также и для засева ферментера в количестве 1–2% от объема питательной среды. Культивирование осуществляли на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) в биореакторе LiFlus SL-15L (“Biotron”, Южная Корея) объемом 15 л, с коэффициентом заполнения средой 0.7 при температуре $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, скорости вращения мешалки 100 об./мин и скорости подачи стерильного воздуха 1 л/л · мин⁻¹.

Для масштабирования процесса использовали полупромышленный ферментер LiFlus SP-100L (“Biotron”) объемом 100 л. В качестве индуктора синтеза целевого белка в клетках *E. coli* BL21/pET-IFN- γ использовали изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG) (“Anatrace Products”, США). Культивирование заканчивали в конце логарифмической – начале стационарной фазы роста при достижении оптической плотности OD₅₅₀ 3.7–4.3. Биомассу отделяли центрифугированием на проточной центрифуге Z41 (“СЕРА”, Германия) при 15000 g и скорости потока 60 л/ч. Влажную биомассу взвешивали и определяли в ней содержание целевого белка в %.

Содержание рекомбинантного белка. Содержание белка в биомассе определяли методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с окрашиванием Кумаси G-250 (“Sigma”, США) и последующим денситометрическим сканированием окрашенных гелей. Относительное содержание белка определяли с использованием системы визуализации GelDoc Go с ПО Image Lab (“Bio-Rad Laboratories”, США).

Выделение и очистка ИФН- γ . Образец биомассы (10 г влажных клеток) суспендировали в 100 мл буферного раствора, содержащего 1 мМ фенол-метилсульфонилфторида (ингибитор протеиназ), 20 мМ трис-НСl, рН 8.0, и разрушали ультразвуком с последующим центрифугированием. Для первичной очистки и осветления супернатанта, содержащего ИФН- γ в растворимой форме, применяли жидкий сорбент Аммофлок-25 (“Физлаб-прибор”, Россия).

Очистку целевого белка вели каскадной хроматографией на ион-обменных сорбентах Q-сефароза и SP-сефароза, уравновешенных 20 мМ

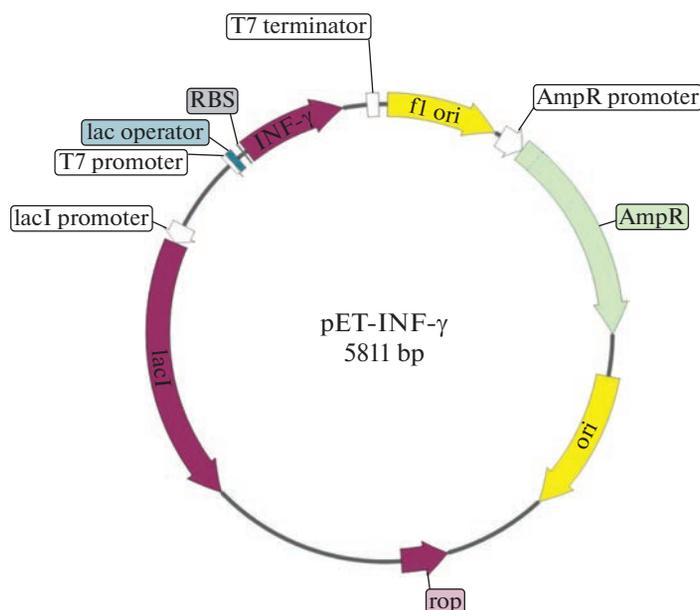


Рис. 1. Генетическая карта плазмидного вектора pET-INF- γ : T7 promoter – промотор гена белка 10 фара T7; T7 tag – лидерная последовательность гена 10 бактериофага T7; INF- γ – последовательность, кодирующая зрелый интерферон-гамма; T7 terminator – терминатор бактериофага T7.

трис-НСI буфером, рН 8.0. Колонку с Q-сефарозой, на которую целевой белок не сорбировался, отсоединяли после промывки раствором 20 мМ трис-НСI, рН 8.0. Элюцию ИФН- γ с колонки с SP-сефарозой проводили линейным градиентом 0–1.0 М NaCl в 20 мМ трис-НСI, рН 8.0.

Анализ содержания целевого белка. Белковый состав образцов анализировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с окрашиванием красителем Кумасси G-250 (“Sigma”, США), анализ гелей проводили методом, описанным выше.

Определение специфической активности. Специфическую (противовирусную) активность определяли микрометодом в 96-луночных планшетах с плоским дном, по подавлению цитопатического действия (ЦПД) тест-вируса энцефаломиокардита (ЕМС), штамм “Колумбия” в дозе 100 ЦПД₅₀ (трехкратное разведение) в культуре клеток человека линии Л-68 (диплоидные клетки (фибропласты) из здоровой ткани легкого) как описано в работе [8]. В качестве контрольного препарата использовали препарат Ингарон (интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат), 100000 МЕ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Человеческий ИФН- γ является примером рекомбинантного белка, легко синтезируемого в клетках *E. coli*, но склонного к агрегации. Использование векторов, обеспечивающих конститутивную экспрессию, обычно позволяет добиться

накопления целевого белка до 30% от суммарного белка бактериальных клеток, однако больше двух третей этого белка содержится в тельцах включения, частично или полностью денатурированы и поэтому лишены биологической активности [7]. В работе для конструирования штамма *E. coli* BL21/pET-INF- γ был выбран вариант индуцибельной экспрессии. Последовательность целевого гена клонировали в составе вектора pET21 (рис. 1), обеспечивающего в сочетании со штаммом *E. coli* BL 21 строгий контроль синтеза РНК. Дерепрессия промотора осуществлялась добавлением в состав питательной среды IPTG.

Выбор условий культивирования штамма-продуцента. Общие закономерности культивирования рекомбинантных микроорганизмов, в которых целевой ген находится под контролем индуцибельного промотора, подробно описаны [9], что не исключает необходимость подбора оптимальных параметров роста и синтеза целевого продукта для каждого рекомбинантного штамма. При выборе условий культивирования штамма *E. coli* BL 21/pET-INF- γ в качестве контролируемых параметров использовали: время подачи индуктора, концентрацию индуктора, температуру и продолжительность инкубации с индуктором.

В экспериментах по выбору времени подачи индуктора было отмечено, что внесение IPTG в концентрации 0.1 мМ в логарифмической фазе роста культуры в диапазоне оптической плотности OD₅₅₀ культуральной жидкости (КЖ) от 1.0 до 1.6 с последующей инкубацией при 37°C в течение 5–6 ч приводило к стабильно высокому уров-

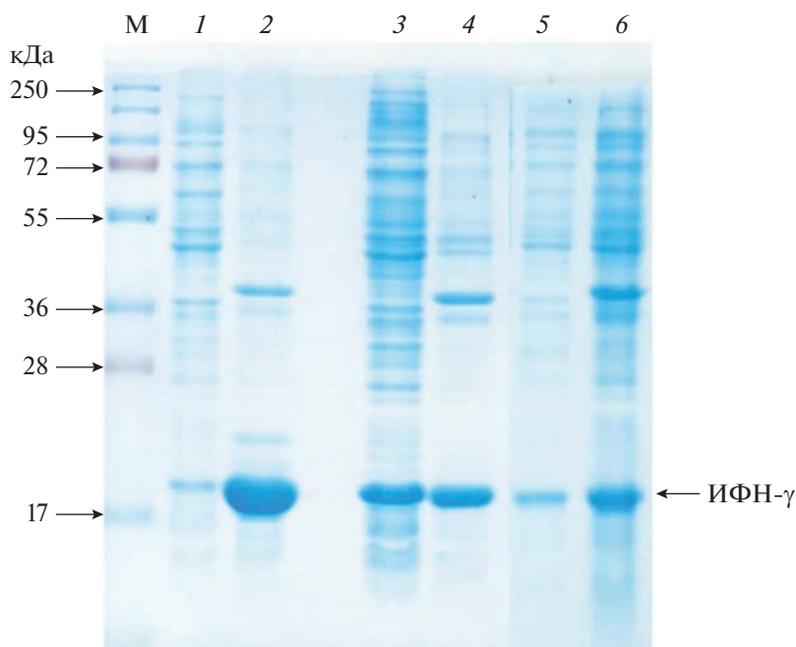


Рис. 2. Электрофореграмма фракций клеточных белков бактерий *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ после дезинтеграции и центрифугирования: 1, 3, 5 – белки супернатанта после инкубации с IPTG при температуре 37, 25, 20°C соответственно; 2, 4, 6 – осадки клеточных белков после инкубации с IPTG при температуре 37, 25 и 20°C; М – маркер молекулярной массы белков (17–250 кДа). Пробы для электрофореза получали путем осаждения одинакового количества клеток, стандартизованных по оптической плотности.

ню синтеза целевого белка, экспрессируемого в тельцах включения. По данным денситометрического анализа электрофореграмм клеток, содержание целевого белка с молекулярной массой $18.0 \pm \pm 0.5$ кДа, соответствующего массе ИФН- γ , составляло от 46 до 48% от содержания общего клеточного белка. Удельный выход биомассы был равен 3.6–3.7 г/л. Дальнейшее увеличение времени культивирования не приводило к повышению содержания целевого белка в биомассе.

Для определения минимального количества IPTG, достаточного для полноценной индукции синтеза целевого белка, индуктор вносили в инкубационную среду в концентрациях 0.1, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 и 0.01 мМ.

Температуру культивирования поддерживали на уровне 37°C. Результаты белкового электрофореза показали, что IPTG в концентрации 0.01 мМ индуцирует синтез ИФН- γ в количестве 30–32% от суммарного клеточного белка. Максимальное содержание целевого белка в клетках (46–49%) достигалось через 5–6 ч инкубации при концентрации IPTG 0.04–0.05 мМ, что сопоставимо с результатами, полученными при внесении индуктора в концентрации 0.1 мМ.

Известно, что повышение выхода растворимого белка может быть достигнуто в результате индукции белкового синтеза при пониженной температуре [9]. Для подтверждения этого было проведено культи-

вирование в ферментере LiFlus SP-100L (“Biotron”) рекомбинантного штамма *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ после внесения индуктора при температурах 37, 25 и 20°C.

Локализацию белка ИФН- γ в клетках бактерий определяли электрофоретически после дезинтеграции клеток биомассы, центрифугирования и анализа содержания целевого белка в осадке и супернатанте. На рис. 2 приведены электрофореграммы белковых фракций осадков и супернатантов образцов биомасс, полученных при инкубации при разных температурных режимах.

Из результатов, представленных на рис. 2, следует, что при культивировании штамма-продукта при 37°C и внесении индуктора в течение 5–6 ч более 90% синтезируемого ИФН- γ содержалось в осадке телец включения (дорожка 2). При снижении температуры культивирования до 25°C после подачи индуктора содержание целевого белка в клетках через 8–9 ч от начала культивирования достигало 32–37%. При этом белок накапливался в равной степени как в растворимой форме (в цитоплазме и периплазме) (дорожка 3), так и в тельцах включения (дорожка 4). Дальнейшее понижение температуры культивирования до 20°C с индукцией приводило к замедлению роста и снижению содержания целевого белка до 20–25%, при этом белок преимущественно (до 70%) накапливался в тельцах включения (дорожка 6). Поскольку результат оказался неудовлетвори-

Таблица 1. Данные по выходу из 10 г биомассы очищенного белка ИФН- γ

Стадия очистки ИФН- γ	Раствор белка, мл	Суммарный белок, мг	Белок ИФН- γ , мг	Содержание белка, %
Лизат клеток после центрифугирования	100	240	136	56.6
Осветление Аммофлоком-25	110	180	116	64.4
Ионообменная хроматография	16.6	52	50	96

тельным, указанную температуру в дальнейшем не использовали.

Выход биомассы и целевого белка, его содержание и локализации в клетках, полученные для ферментера LiFlus SL-15L объемом 15 л, полностью воспроизводились в условиях масштабирования в ферментере LiFlus SP-100L объемом 100 л.

Таким образом, подобраны условия культивирования нового штамма-продуцента ИФН- γ *E. coli* VL 21/pET-IFN- γ для двух типов биореакторов со следующими характеристиками и условиями выращивания: коэффициент заполнения средой 0.7–0.8; подача воздуха 1.0 л л⁻¹ · мин⁻¹; скорость вращения мешалки 100 об./мин, температура (37.0 ± 1.0)°С; внесение индуктора (IPTG) в конечной концентрации 0.04–0.05 ммоль/л при оптической плотности КЖ OD₅₅₀ 1.0–1.6; продолжительность культивирования после индукции в течение 5–6 ч. Удельный выход биомассы составлял 3.5–3.6 г/л КЖ. Содержание целевого белка – 46–48% от суммарных клеточных белков, при этом белок синтезировался, в основном, в тельцах включения (более 90%).

Снижение температуры культивирования штамма после внесения IPTG до 25°С и дальнейшая инкубация в течение 8–9 ч приводили к тому, что экспрессия целевого белка достигала уровня 32–33% в ферментере объемом 15 л и 33–37% – в 100 л ферментере. Накопление белка происходило в равной степени в тельцах включения и периплазме. Выход биомассы составлял 4.6–4.7 г/л КЖ при культивировании в 15-литровом ферментере и 4.6–5.0 г/л – 100-литровом.

Выделение и очистка ИФН- γ . Для того, чтобы оценить эффективность выделения рекомбинантного ИФН- γ , синтезируемого в растворимой форме (~50%), была использована биомасса, содержащая целевой белок в периплазме, полученная в ферментере LiFlus SP-100L при снижении температуры до 25°С после подачи индуктора. Суспензию клеток в буфере для разрушения помещали в ледяную баню и разрушали ультразвуком (22 кГц) до снижения OD₅₅₀ на 45–50% от исходного значения. Затем суспензию центрифугировали при 12000g в течение 45 мин и при 4°С.

Для грубой очистки и осветления раствора после центрифугирования в супернатант, содержащий целевой белок, добавляли жидкий сорбент

Аммофлок-25 в количестве 10% от объема раствора белка. Полученный раствор инкубировали 12 ч при 2–8°С и центрифугировали при 12000 g 30 мин и 4°С.

Очистку целевого белка проводили методом каскадной хроматографии на ионообменных сорбентах Q-сефароза и SP-сефароза. Колонки с ион-обменными сорбентами Q-сефароза (20 мл) и SP-сефароза (20 мл) уравнивали 20 мМ трис-НСl буфером, рН 8.0, наносили раствор белка, после чего колонки промывали тем же буфером. Колонку с Q-сефарозой, на которой целевой белок не сорбировался, отсоединяли. Белок элюировали с колонки с SP-сефарозой линейным градиентом 0–1 М NaCl в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 8.0. Фракции целевого белка с оптической плотностью от 0.25 о.е. анализировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 3). Из представленных данных видно, что чистота полученного белка превышала 95%. Фракции, содержащие ИФН- γ , объединяли и диализовали против буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl, рН 8.0, и 50 мМ NaCl. Выход целевого белка составил 50 ± 5 мг из 10 г биомассы (5 мг из 1 г влажных клеток). Данные приведены в табл. 1. Как известно из литературных данных, выход целевого белка из биомассы *E. coli*, содержащей ИФН- γ в тельцах включения, колебался в диапазоне от 2.5 до 5.0 мг из 1 г биомассы [1, 10]. Следовательно, количество высокоочищенного белка, полученного только из растворимой фракции в нашем исследовании, соответствовало максимальному выходу белка из штамма, продуцирующего ИФН- γ в тельцах включения. Можно предположить, что дальнейшее совершенствование условий культивирования позволит увеличить продукцию ИФН- γ в растворимой форме и как следствие, повысить выход целевого белка, как минимум в 2 раза.

Определение специфической противовирусной активности. Анализ специфической активности белка в культуре клеток Л-68 показал, что активность полученного препарата ИФН- γ в 1.7 раза превышала показатель контрольного препарата Ингарон (1.77 × 10⁵ против 1 × 10⁵ МЕ).

Сконструирован рекомбинантный индуцибельный штамм *E. coli* VL 21/pET-IFN- γ – продуцент интерферона гамма человека, обеспечивающий высокий уровень экспрессии целевого белка. В ре-

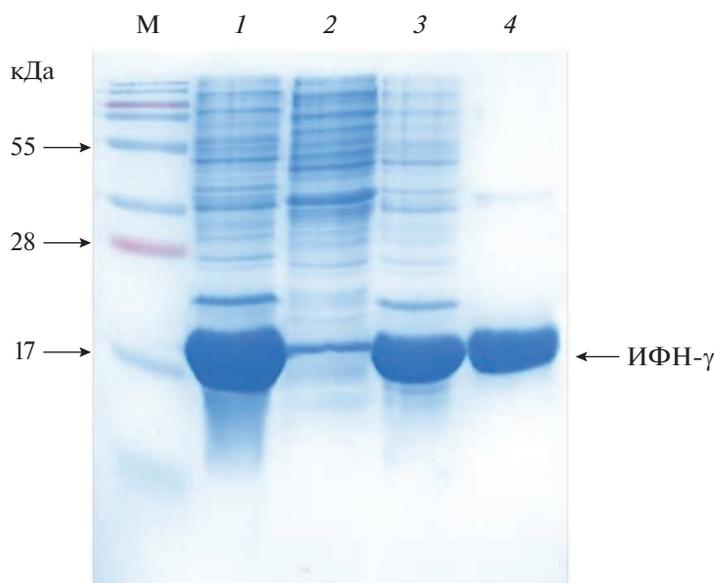


Рис. 3. Электрофореграмма белковых фракций, полученных в процессе очистки ИФН- γ : М – маркер молекулярной массы белков (17–250 кДа), 1 – лизат биомассы; 2 – осадок при осветлении; 3 – раствор белка после осветления аммофлоком-25; 4 – конечный препарат (белок ИФН- γ).

зультате оптимизации параметров культивирования штамма максимальное накопление целевого белка в количестве 32–37% от общего количества клеточных белков достигалось при индукции 0.04–0.05 мМ IPTG в середине логарифмической фазы и последующем культивировании при 25°C в течение 8–9 ч. При этом накопление белка происходило в равной степени в тельцах включения и в растворимой форме.

Разработан способ выделения и очистки интерферона гамма, содержащегося в клетках в растворимой форме. Способ очистки включал дезинтеграцию клеток ультразвуком, предпочистку жидким сорбентом, очистку каскадной ионообменной хроматографией с последующим диализом. Показано, что разработанный способ позволял получить из 1 г влажной биомассы до 5 мг препарата с чистотой более 95% и высокой специфической (противовирусной) активностью.

Таким образом, удалось разработать систему, позволяющую получать белок в растворимой форме, что облегчает его выделение и очистку, поскольку процедура не содержит таких стадий, как денатурация и ренатурация, на которых происходят основные количественные потери белка и потери его биологической активности.

Работа выполнена в рамках государственного задания, Тема ГЗ-39/21 “Отработка технологии препаративной наработки и очистки рекомбинантных белков”.

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам ОБТК ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора: С.В. Усовой, Е.Ф. Перышкиной,

Е.С. Башкиной – за проведение экспериментов по определению специфической (противовирусной) активности препарата ИФН- γ .

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pandey R., Prabhu A.A., Dasu V.V. // Separation Science and Technology. 2018. V. 53. № 3. P. 487–495. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1395463>
2. Razaghi A., Owens L., Heimann K. // J. Biotechnol. 2016. V. 240. P. 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>
3. Khalilzadeh R., Shojaosadati S.A., Bahrami A., Magsoudi N. // Biotechnology Letters. 2003. V. 25. № 23. P. 1989–1992. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000004390.98648.25>
4. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
5. Malhotra A. // Methods in Enzymol. 2009. V. 463. P. 239–258. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63016-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63016-0)
6. Leibly D.J., Nguyen T.N., Kao L.T., Hewitt S.N., Barrett L.K., Van Voorhis W.C. // PLOS ONE. 2012. V. 7. № 12. P. e52482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052482>

7. Tileva M., Krachmarova E., Ivanov I., Maskos K., Natcheva G. // Protein Expr. Purif. 2016. V. 117. P. 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.022>
8. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Т.2. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. С. 2740–2749. <https://femb.ru/record/pharmасorea14>
9. Хайруллин Р.Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*: учебн. пособие. / Ред. Р.Ф. Хайруллин, Р.Г. Киямова, А.А. Ризванов. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 2018. 142 с.
10. Закабунин А.И., Барановская Г.А., Пустошилова Н.М., Майстренко В.Ф., Гаврюченкова Л.П., Громова О.А. Способ получения рекомбинантного интерферона – гамма человека. Патент РФ. 1999. № 2132386.

Production of Soluble Human Gamma Interferon in the *Escherichia coli* Expression System with a Decrease in Cultivation Temperature

E. A. Volosnikova^{a, *}, T. I. Esina^a, D. N. Shcherbakov^a, N. V. Volkova^a,
Ya. S. Gogina^a, T. A. Tereshchenko^a, and E. D. Danilenko^a

^a State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

*e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

A recombinant strain producing human gamma interferon (IFN- γ) *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ was constructed, providing a high level of its expression. A method has been developed for obtaining a soluble form of recombinant IFN- γ , consisting of the processes of producing a biomass of a producer strain containing a target protein in an amount of 32–37% of the total content of cellular proteins, protein isolation and purification. The purification process included the stages of disintegration, clarification of the cell lysate, chromatographic purification and dialysis. The developed method makes it possible to obtain from 1 g of wet biomass up to 5 mg of the drug with a purity of at least 95% and high specific (antiviral) activity.

Keywords: human recombinant gamma interferon, producer strain, cultivation, chromatography, specific activity

УДК 579.6,606

ОБРАЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНОВ У *Emericellopsis alkalina* ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. Е. Куварина¹, *, М. А. Суконников¹, Е. А. Рогожин^{1, 2}, М. В. Серебрякова³, А. В. Тимофеева³, М. Л. Георгиева^{1, 4}, В. С. Садыкова¹, **

¹ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997 Россия

³ НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119234 Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

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

**e-mail: sadykova_09@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 20.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Проведена оценка способности образования противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А у штамма гриба *Emericellopsis alkalina* E101 в различных биотехнологических системах при нейтральных и щелочных рН. Установлено, что новый апробированный мембранно-жидкостной способ культивирования при рН 10 увеличивал выход основного компонента эмерициллипсина А в 1.7 раза. Показано, что новый способ культивирования штамма *E. alkalina* E101 также способствовал синтезу различных изоформ основного компонента эмерициллипсина А.

Ключевые слова: антибиотики, *Emericellopsis alkalina*, эмерициллипсин А, изоформы эмерициллипсина А

DOI: 10.31857/S0555109923020095, **EDN:** LLSKOD

В последние годы антимикробные пептиды (АМП) привлекают внимание исследователей как новые терапевтические агенты, имеющие ряд преимуществ: высокую селективность, низкую иммуногенность, хорошую возможность проникновения в клетку-мишень, и меньший риск развития устойчивости за счет действия на клеточную стенку или мембрану. За последние два десятилетия общее число АМП, одобренных на основных фармацевтических рынках, увеличилось в два раза [1]. К основным недостаткам АМП, которые препятствуют их применению, можно отнести цитотоксичность. В тоже время природные пептиды используют как для разработки лекарственных препаратов, так и в качестве модели для создания синтетических структурных аналогов на их основе [2]. На сегодняшний день АМП признаны многообещающим альтернативным классом новых соединений для борьбы с антибиотикорезистентностью [3, 4]. Увеличение выхода природного соединения возможно за счет расширения скрининга, усовершенствования методов экстракции, использования химического синтеза, а также за счет синтеза в клетках прокариот. Эти стратегии открывают возможность получения искусственных структурных аналогов, которые могут пре-

взойти по своим фармакодинамическим или фармакокинетическим свойствам оригинальное природное соединение [5].

Открытие пептаибиолов у микроскопических грибов, обитающих в холодных и засоленных почвах, в морских глубинах, а также в других экстремальных местообитаниях, расширяет возможности поиска новых антибиотиков, которые могут служить прототипами новых лекарственных средств. Известно, что эта группа нерибосомальных пептидов синтезируется исключительно микроскопическими грибами. Как правило, продуцент синтезирует комплекс из нескольких пептаибиолов, которые представляют собой гомологичные по структуре соединения, различающиеся расположением в пептидной цепи на одну или несколько аминокислот, что обуславливает также различия в их биологической активности. Из культур различных штаммов гриба *Emericellopsis salmosynnemata* было выделено до 11 изоформ зервамицинов, среди которых преобладающими являлись зервамицин IА (ZrvIА) и зервамицин IВ (ZrvIВ) [6]. Zrv-IА и Zrv-IВ по своей структуре отличаются друг от друга только одним аминокислотным остатком в четвертом положении. Несмотря

на большую гомологию в структурах, для этих изоформ показаны различия в цитотоксичности, нейротоксичности и антибактериальной активности [7]. Альбупептины В и D – пептаиболы, которые содержат оба стереоизомера изовалина (Iva) – D- и L- конфигурации. Они активны в отношении *Bacillus cinerea*, причем эффект ингибирования зависит от структуры и количества присутствующих остатков Iva (IC_{50} : один остаток Iva = 49.6 мкг/мл; два остатка Iva = 38.9 мкг/мл; три остатка Iva = 35.2 мкг/мл; четыре остатка Iva = 24.5 мкг/мл). Альбупептин А также неактивен в отношении *Phytophthora infestans* (IC_{50} , >100 мкг/мл), а соединение D активно (IC_{50} , четыре остатка Iva = 16.3 мкг/мл) [8]. Из штаммов гриба *Emericellopsis alkalina* нами ранее был выделен комплекс пептаиболов с выраженной противогрибковой активностью, представляющий собой 5 изоформ пептидов с единичной заменой аминокислоты – эмерициллипсина А-Е. Доминирующий компонент комплекса – пептид эмерициллипсин А (EmiA) обладал значительной противогрибковой активностью в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью. Ингибирующая активность EmiA и его дегидроформы против азолустойчивых патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. проявляется на уровне амфотерицина В – 1 мкг/мл, а для клинических патогенных изолятов *Cryptococcus* spp. превосходит препарат сравнения в 2–4 раза. В то же время активность изоформ В и С значительно ниже, а формы D и Е оказались неактивны в отношении патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. [9, 10]. Ранее было показано, что при культивировании количество синтезируемых изоформ и выход EmiA различался у разных штаммов.

Структурное многообразие синтезируемых пептаиболов может варьировать также у одного и того же штамма-продуцента в зависимости от способов культивирования, добавления предшественников и других физико-химических факторов. Недавно Х. Нао с соавт. [11] из штамма *Acretonium* sp. IMB18-0, культивируемого в присутствии биомассы бактерий, выделили новые изоформы акремопептаиболов, отличающиеся от уже описанных в литературе антимикробной активностью и отсутствием в молекуле высококонсервативных остатков треонина и гидроксипролина. Эти изоформы проявляли выраженную антимикробную активность в отношении метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Candida albicans*. Штамм *Trichoderma longibrachiatum* Rifai DMG-3-1-1 синтезирует 23 пептаибола. Структуры 13 новых пептаиболов были определены с помощью ЯМР и MALDI-MS/MS. Тщательное сравнение структур 1–23 показало, что в структурах варьируют только семь остатков: 2 (Gln2/Asn2), 3 (Ile3/Val3), 4 (Ile4/Val4), 6 (Pro6/Hyp6), 8 (Leu8/Val8), 10 (Pro10/Hyp10) и 11 (Leu11/Ile11/Val11). Пептаиболы 2, 5, 9, 11, 21 и 22 про-

являли умеренную антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* MRSA T144, а также более сильную цитотоксичность в отношении клеток BV2 и MCF-7 по сравнению с другими пептаиболами этого штамма. При этом было показано, что аминокислотные остатки 2, 3 и 4 сильно влияют на цитотоксичность соединения [12]. Открытие новых уникальных структур АМП и знание принципов зависимости активности от структуры дает информацию для создания химическим синтезом новых соединений с большей противогрибковой активностью и меньшей токсичностью для хозяина, чем у природных соединений [5].

Цель работы – сравнительный анализ многообразия продуцируемых изоформ эмерициллипсина и оценка накопления основного компонента эмерициллипсина А при культивировании в различных биотехнологических системах и при разных рН.

МЕТОДИКА

Для оценки накопления и разнообразия изоформ эмерициллипсина был использован типовой штамм микелиального гриба *Emericellopsis alkalina* E101 (ВКМ F-4108; CBS 127350) из коллекции “Грибы экстремальных местообитаний” кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Россия). Штамм был выделен из образца почвы с побережья содового озера Танатар (Алтайский край, Россия) [13]. В результате скрининга 64 штаммов этого вида было выявлено [14], что штамм *E. alkalina* E101, наряду с изученным ранее штаммом-продуцентом *E. alkalina* A118 (ВКМП F-1428), был наиболее продуктивным по выходу основного компонента EmiA.

Штамм-продуцент *E. alkalina* E101 выращивали на специализированной жидкой щелочной среде, подобранной ранее [15]. Для приготовления сред с различными рН использовали буферы: цитратно-фосфатный для рН 7.0, фосфатно-цитратный для рН 9.0 и карбонатно-бикарбонатный для рН 10.0. Культивирование проводили в течение 7, 14 и 21 сут стационарным способом в колбах Эрленмейера на 750 мл, глубинным способом на шейкере-инкубаторе Innova 40R (“Eppendorf New Brunswick”, США), а также в ферментере мембранно-жидкостным способом на матрице из бактериальной целлюлозы. Получали матрицы бактериальной целлюлозы культивированием штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 в стационарных условиях при температуре 27°C в течение 14 сут на жидкой среде Н-5. Полученную матрицу бактериальной целлюлозы отмывали от клеток продуцента 0.1 н раствором NaOH и дистиллированной водой, лиофильно высушивали и стерилизовали. Стационарное мембранно-жидкостное культивирование в щелочной среде осу-

шествляли на матрице бактериальной целлюлозы в качестве подложки.

Культуральную жидкость (КЖ) отделяли фильтрацией через мембранные фильтры на воронке Зейтца под вакуумом. Затем КЖ экстрагировали этилацетатом или бутанолом в соотношении 5 : 1 3 раза. Полученные экстракты упаривали в вакууме на роторном испарителе “Rotavapor-RVüchi” (Швейцария) при 42°C досуха, остаток растворяли в водном 50%-ном этаноле и получали спиртовые концентраты.

Оценку активности в отношении условно-патогенных грибов проводили в КЖ до экстракции и после, а также в экстрактах мицелия. Антимикробную активность определяли с помощью стерильных бумажных дисков (“НИИ Пастера”, Россия), смоченных в антибиотике и высушенных в стерильных условиях. В качестве контроля использовали стандартные диски с флуконазолом для грибов (40 мкг, “НИИ Пастера”, Россия) и амоксициллином/клавулоновой кислотой для бактерий (20/10 мкг, “НИИ Пастера”, Россия). Для оценки фунгицидной активности использовали тест-штаммы: плесневый гриб *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжи *Candida albicans* ATCC 2091.

Антибактериальную активность оценивали по отношению к грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922 и грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Тест-культуру *B. subtilis* ATCC 6633 выращивали на среде Гаузе № 2 следующего состава (г/л): триптон – 2.5 (или бульон Хоттингера – 30 мл), пептон – 5, хлорид натрия – 5, глюкоза – 10; *E. coli* ATCC 25922 на среде LB (триптон-соевый агар). Культуры грибов *A. niger* INA 00760 и *C. albicans* ATCC 2091 выращивали на среде Чапека. Предварительно культуры выращивали в пробирках со скошенным питательным агаром, после чего клетки с поверхности агара суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland (1.5×10^8 КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Для посева использовали суточные культуры бактерий и пяти-суточные культуры грибов и дрожжей. Все тест-культуры получены из коллекции культур “НИИНА им. Г.Ф. Гаузе”.

Полученные спиртовые концентраты объединяли, упаривали досуха на роторном испарителе (“Labconco”, США) и далее перерастворяли в 100 мкл 50%-ного этанола. Исследуемые в работе концентраты анализировали методом обращенно фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ). Анализ проводили на микроколоночном хроматографе Милихром А-02 (ЗАО “Эконова”, Новосибирск), использовали колонки из нержавеющей стали, Nucleosil-100-5-C18 ($L = 75.0$ мм; $D = 2.0$ мм; $d = 5$ мкм, “Machegey-Nagel”, Германия). Детектирование в ходе анализа проводили при 214 нм. Скорость потока 100 мкл/мин, температура термостатирования колонки 35°C, инъекционный объем – 15 мкл. Состав подвижной фазы: компонент А – H₂O (MQ) + + 0.02%-ная ТФУ (ВЭЖХ, “Sigma-Aldrich”, Герма-

ния), компонент Б – ацетонитрил + 0.02%-ная ТФУ. Градиент подвижной фазы от 0 до 100% Б за 40 мин и далее в изократическом режиме 4 мин при 100%-ном содержании элюента В.

Для анализа методом MALDI-TOF MS 0.3 мкл фракции ацетонитрил-вода (собранной при разделении методом ВЭЖХ) образца и 0.5 мкл 2,5-дегидроксibenзойной кислоты (“Sigma-Aldrich”, Германия) раствор в 20%-ном ацетонитриле + 79.5% вода (MQ) + 0.5% ТФУ (ВЭЖХ, “Sigma-Aldrich”) в концентрации 20 мг/мл смешивали на мишени спектрометра. Запись спектров и MS-анализа проводили на MS-спектрометре MALDI-TOF (Ultrafle Xtreme, “Bruker Daltonics”, Германия) с УФ-лазером (Nd) в режиме регистрации положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность определения массы составляла около 1 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для штамма *E. alkalina* E101 [14], первоначально исследовали образование эмерициллипсина в культуральной жидкости и мицелии при нейтральных и щелочных начальных pH (7.0, 9.0, 10.0) в стационарных и глубинных условиях культивирования. Было показано, что содержание EmiA в мицелии всегда оставалось значительно ниже, чем в КЖ в одних и тех же вариантах. Для мицелия отмечено большее содержание EmiA в условиях глубинного культивирования, в то время как в КЖ выявлено большее содержание EmiA в стационарных условиях во всех исследованных вариантах, что свидетельствует о том, что в этих условиях антибиотик лучше экскретирует в культуральную жидкость.

Содержание EmiA в мицелии (0.25 мг/г) достигало максимума на 7 сут при глубинном способе культивирования при pH среды 10.0. Наиболее высокие количества EmiA в КЖ зарегистрированы на 14 сут роста при всех исследованных начальных pH среды, но при щелочных pH (9.0 и 10.0) содержание EmiA было максимально и составило 6.0–6.5 мг/л (рис. 1). Проведенный эксперимент подтвердил, что несмотря на то, что штаммы *E. alkalina* способны к росту и развитию в широком диапазоне pH среды (4.0–11.0) с оптимумом роста при pH 10.0 [13], EmiA лучше образуется в щелочных условиях культивирования.

Алкалофильные грибы *E. alkalina*, обитающие на побережьях засоленных озер, часто сосуществуют с многочисленными и разнообразными прокариотами, образующими на поверхности раздела фаз биопленки. Считается, что моделирование природных условий для продуцента может способствовать увеличению накопления целевых антибиотиков в среде [16]. Было проведено сравнение выхода EmiA при стационарном культивировании и мембранно-жидкостном, где в качестве модели природной бактериальной пленки использовали подложки бактериальной целлюлозы. Наиболь-

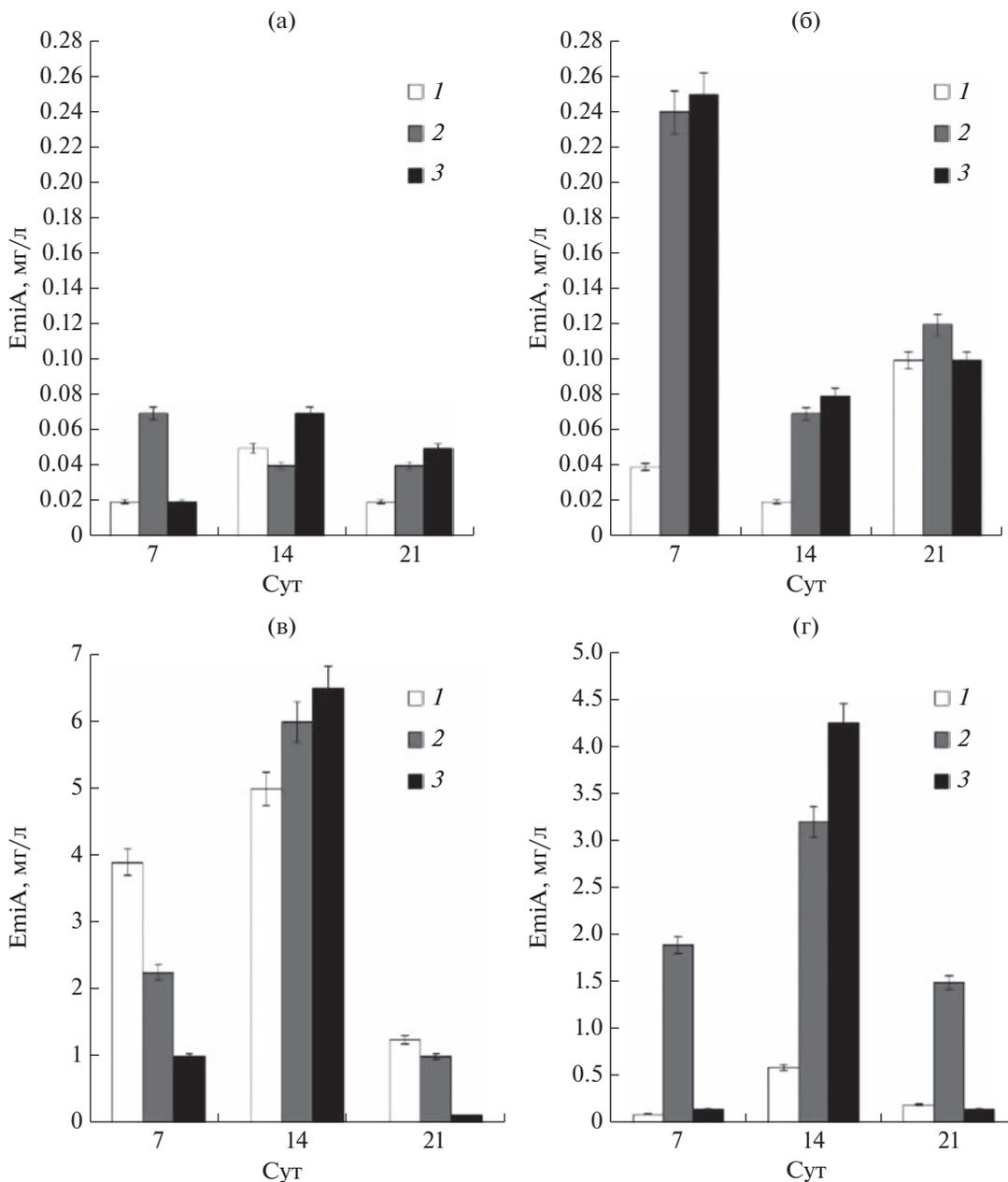


Рис. 1. Динамика образования EmiA (мг/л) при начальных рН 7.0 (1), 9.0 (2) и 10.0 (3) в мицелии (а, б) и КЖ (в, г) *E. alkalina* E101 при поверхностном (а, в) глубинном (б, г) культивировании.

шее содержание EmiA в КЖ и мицелии отмечено при стационарном мембранно-жидкостном культивировании (табл. 1). При росте на бактериальной целлюлозе в качестве подложки выход EmiA

у штамма *E. alkalina* E101 увеличивался в 1.7 раза по сравнению с поверхностным способом культивирования и составил 11.05 мг/л. При этом было установлено, что помимо основного целевого

Таблица 1. Содержание EmiA в штамме *Emericellopsis alkalina* E101 при различных типах культивирования

Тип культивирования	EmiA в КЖ, мг/л	EmiA в мицелии, мг/г
Поверхностное	6.50 ± 0.20	0.07 ± 0.01
Глубинное	4.87 ± 0.15	0.25 ± 0.01
Стационарное мембранно-жидкостное	11.05 ± 0.33	0.17 ± 0.01

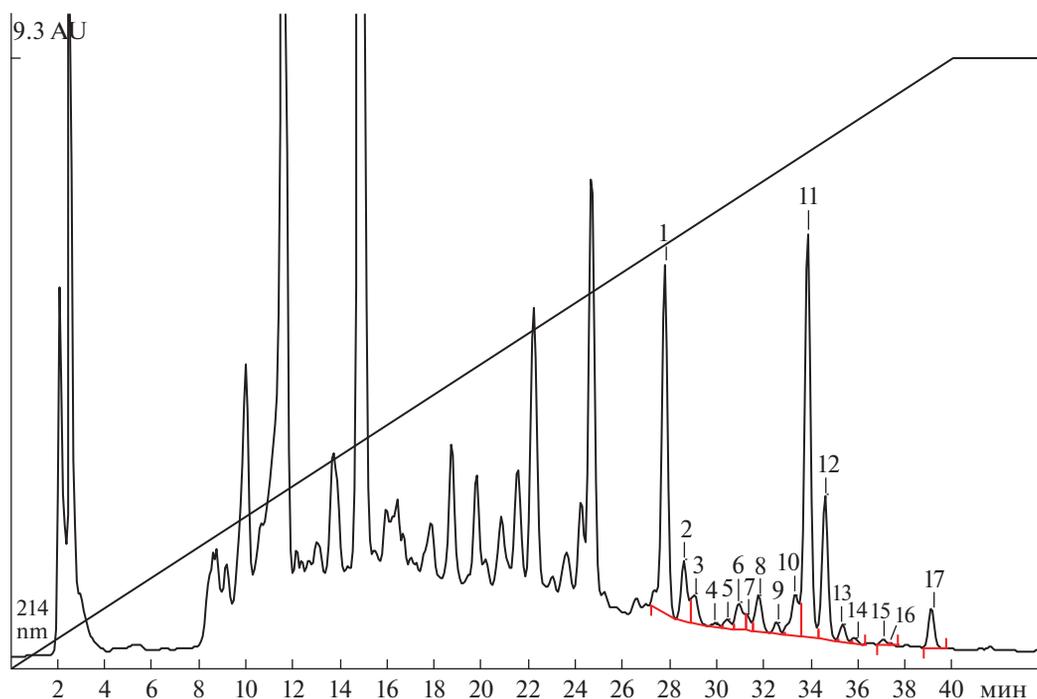


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ спиртового объединенного концентрата в градиенте концентрации ацетонитрила.

пептаибола EmiA синтезируются другие минорные изоформы, ранее не обнаруженные в стационарных условиях. При этом экстракт из КЖ и мицелия, полученный в мембранно-жидкостных

условиях культивирования проявлял активность в отношении грамотрицательных бактерий, в то время как экстракт, полученный в условиях стационарного культивирования был не активен в

Таблица 2. Времена удерживания пиков на хроматограмме (рис. 2), данные о массах молекулярных ионов компонентов, содержащихся в пиках с 1 по 17*

Номер хроматографического пика	Время удерживания пика, мин	Масса $[M + H]^+$, Да
1	27.90	1008.7; 1022.7*
2	28.73	990.7; 1022.7
3	29.17	994.5; 1036.7; 1069.6
4	30.07	994.5 ; 1052.8
5	30.55	994.5; 1022.8; 1036.8; 1052.8
6	31.04	994.5; 1022.8
7	31.36	825.5 ; 994.5; 1022.8
8	31.89	825.5; 994.5; 1022.8
9	32.64	1036.8
10	33.43	994.5; 1019.6; 1036.8
11	33.97	994.5; 1032.9; 1036.8
12	34.70	1050.8
13	35.46	994.5 ; 1050.8
14	35.59	994.5 ; 1016.5
15	37.17	994.5
16	37.46	994.5
17	39.20	994.6 ; 1036.9; 1058.9; 1225.0

* Полу жирным шрифтом выделены массы иона мажорного компонента в составе хроматографического пика.

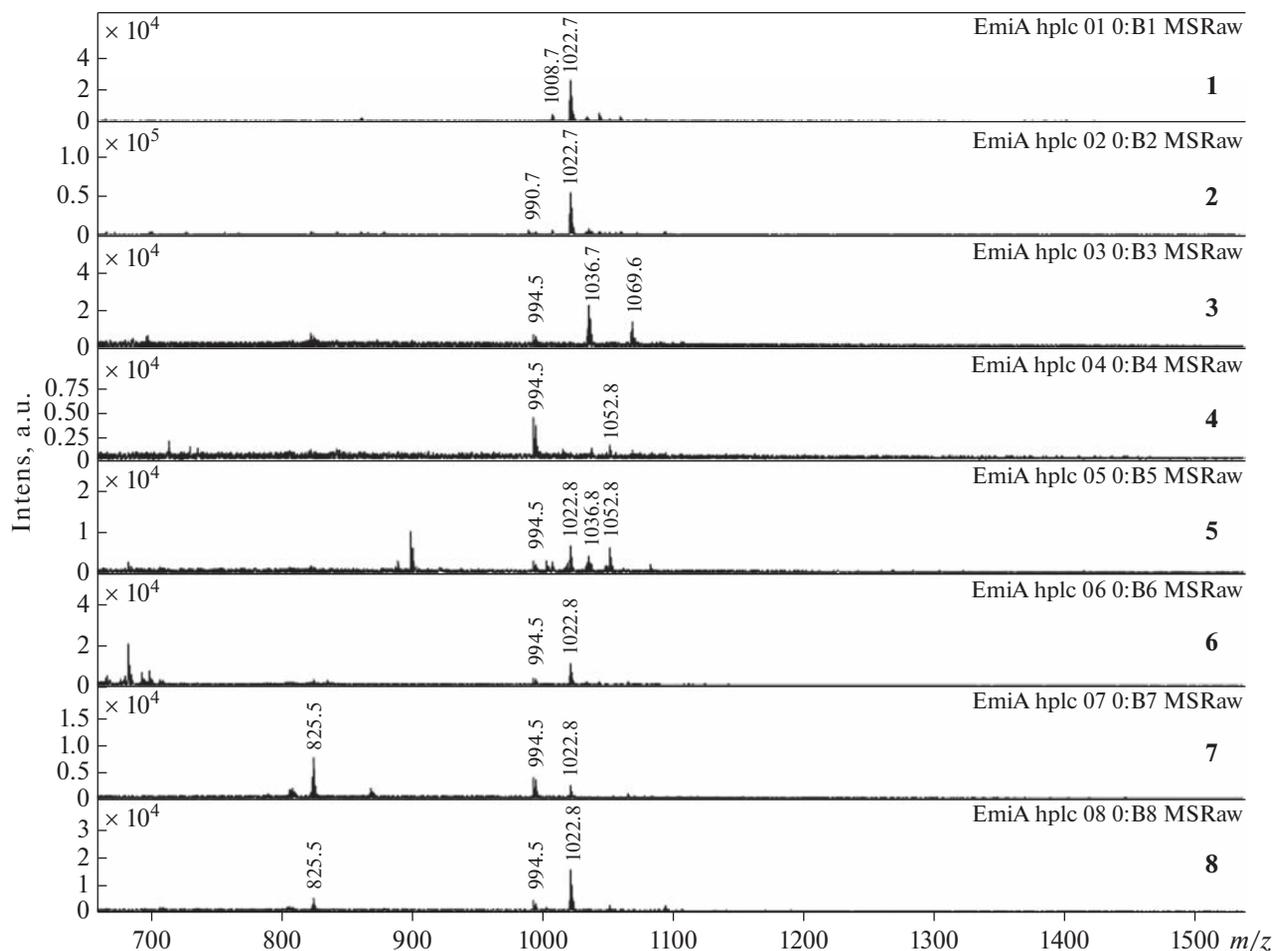


Рис. 3. Масспектры 1-8 (а) и 9-17 (б) хроматографических индивидуальных пиков концентрата, полученного в условиях мембранно-жидкостного культивирования.

отношении этих бактерий, что свидетельствовало о том, что помимо основного противогрибкового компонента в этих условиях продуцент начинал синтезировать антибактериальные соединения.

В дальнейшем была проведена оценка многообразия различных изоформ в пептидном комплексе, синтезируемом при выращивании мембранно-жидкостным способом на мембране из бактериальной целлюлозы. После проведения аналитической ОФ ВЭЖХ были собраны фракции пиков с различным временем удерживания при элюции градиентом концентрации ацетонитрила от 70 до 100% (рис. 2). При этом вблизи области локализации пиков *EmiA* на хроматограмме обнаруживались другие пики с большим и меньшим временем удерживания. Фракции с 1 по 17 (рис. 2) были собраны и проанализированы методом MALD-TOF-MS. Полученные массы молекулярных ионов $[M + H]^+$ компонентов фракций представлены в табл. 2.

Фрагментация индивидуальных пептаиолов с молекулярными массами 1022.8; 994.5 и 1036.7 позволила предположить, что для данных молекул существует несколько возможных (не менее 2) структур пептидов, соответствующих одной и той

же молекулярной массе, однако это требует дальнейшего подтверждения методом ЯМР – спектроскопии (рис. 3).

По результатам исследования разности масс между выделенными компонентами при проведении аналитической ОФ ВЭЖХ (табл. 2) удалось обнаружить, что различие их (по массе) соответствует либо “-CH₂-”-фрагменту ($M = 14$ Да), либо молекуле H₂O ($M = 18$ Да), что представлено графически на схеме (рис. 4). Зависимость показывает молекулярные связи отдельных уже обнаруженных форм пептаиолов, а также ожидаемые молекулярные массы (выделены красным). Ввиду близости времен удерживания компонентов (табл. 2, рис. 2), а также существования цепочки связей между молекулярными массами этих компонентов (рис. 3б), можно предположить, что массы компонентов, соответствуют соединениям одинаковой химической природы. Некоторые массы пептаиолов, представленные на схеме, ранее были не только обнаружены, но и идентифицированы. Так, например, масса 1050 Да соответствует самому *EmiA* [10], а масса 1032.9 Да –

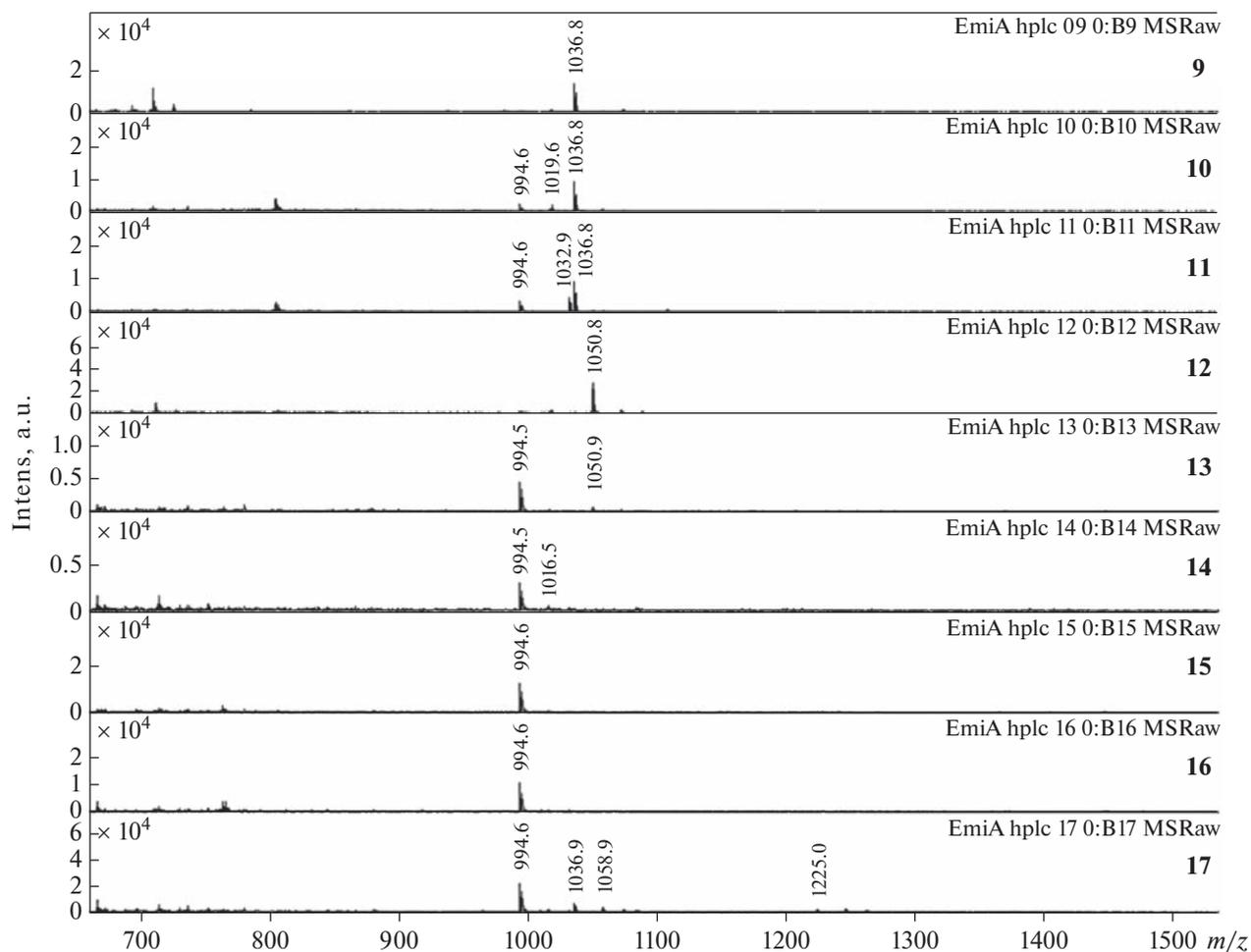


Рис. 3. Окончание.

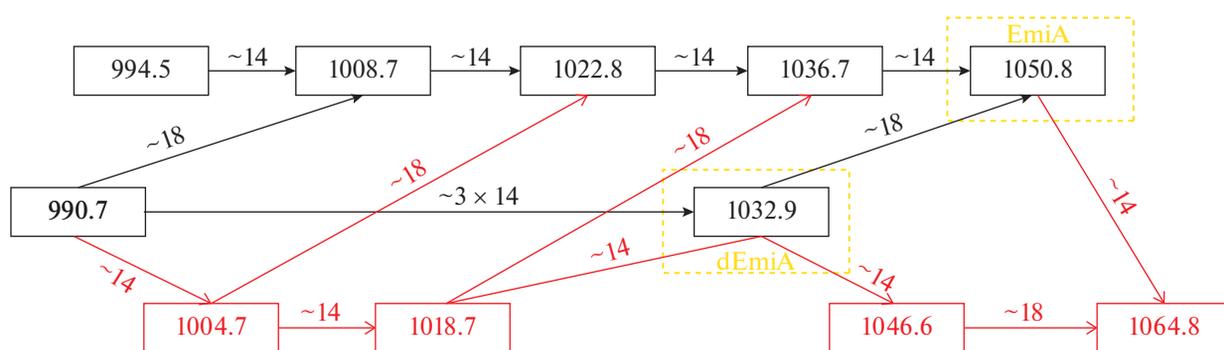


Рис. 4. Схема связи масс различных молекулярных ионов, обнаруженных в ходе анализа (отмечены черным цветом). Стрелками показана связь между формами; над стрелками цифры – разность молекулярных масс между соединенными блоками. Желтые прямоугольники – формы EmiA и dEmiA (дегидроформа); красными показаны предполагаемые молекулярные массы, красные стрелки показывают (предположительно) связи форм, над стрелками указаны разность масс связанных молекулярных форм.

дегидроформе [14]. Таким образом, построенная схема связывает различные формы уже обнаруженных эмерициллипсинов А – Е, с не обнаруженными ранее массами, 1004.7; 1018.7; 1046.8; 1064.8 [10], которые укладываются в общий гомологический ряд. Представленная схема масс но-

сит предположительный характер, ввиду того, что схожесть химических форм пока не была подтверждена более точными спектральными методами. Для выделенных изоформ эмерициллипсинов с массами 1032.9, 1036.7 Да ранее была показана противогрибковая активность [10].

Таким образом, установлено, что новый мембранно-жидкостной способ культивирования продуцентов пептаиболов эмериллипсина приводит к увеличению многообразия синтезируемых природных форм пептидов и увеличению выхода основного соединения в 1.7 раза. Изучение потенциального разнообразия АМП, синтезируемых продуцентом на уровне первичной или пространственной структуры, может послужить стимулом к обнаружению у них других типов биологической активности и созданию новых синтетических пептидов на их основе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-75-00062 (А.Е. Куварина, М.А. Суконников).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lau J.L., Dunn M.K. // Bioorg. Med. Chem. 2018. V. 26. № 10. P. 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
2. Casagrande N., Borghese C., Gabbatore L., Morbiato L., De Zotti M., Aldinucci D. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 16. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22168362>
3. Chen C.H., Lu T.K. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 24. P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>
4. Bin H.A., Jiang X., Bergen P.J., Zhu Y. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 11691. P. 1–56. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>
5. Aldholmi M., Marchand P., Ourliac–Garnier I., Le Pape P., Ganesan A. // Pharmaceuticals. 2019. V. 12. № 4. P. 1–21. <https://doi.org/10.3390/ph12040182>
6. Egorova–Zachernyuk T.A., Shvets V., Versluis K., Heerma W., Creemers A.F.L., Nieuwenhuis S.A.M., Lugtenburg J., Raap J. // J. Pept. Sci. 1996. V. 2. P. 341–350. <https://doi.org/10.1002/psc.72>
7. Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Овчинникова Т.В. // Токсикологический вестник. 2008. № 3. С. 35–38.
8. Otto A., Laub A., Porzel A., Schmidt J., Wessjohann L., Westermann B., Arnold N. // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 34. P. 7449–7459. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501124>
9. Sadykova V.S., Gavryushina I.A., Kuvarina A.E., Markelova N.N., Sedykh N.G., Georgieva M.L., Barashkova A.C., Rogozhin E.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 3. P. 292–297. <https://doi.org/10.1134/S000368382003010>
10. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Kulko A.B., Ivanov I.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. // J. Fungi. 2021. V. 7. № 153. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020153>
11. Hao X., Li Sh., Ni J., Wang G., Li F., Li Q., Chen Sh., Shu J., Gan M. // J. Nat. Prod. 2021. V. 84. № 11. P. 2990–3000. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00834>
12. Zhang S.-H., Zhao X., Xu R., Yang Y., Tang J., Yue X.-L., Wang Y.-T., Tan X.-Y., Zhang G.-G., Li C.-W. // Chem. Biodivers. 2022. V. 19. № e202200627. P. 1–26. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200627>
13. Grum–Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. // IMA Fungus. 2013. V. 4. № 2. P. 213–228. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2013.04.02.07>
14. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Sykonnikov M.A., Efimenko T.A., Markelova N.N., Bilanenko E.N. et al. // Molecules. 2022. V. 27. № 1736. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules27051736>
15. Baranova A.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Andreev Y.A., Rogozhin E.A., Sadykova V.S. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 6. P. 703–710. <https://doi.org/10.1134/S0003683817060035>
16. Galloway W.R.J.D., Bender A., Welch M., Spring D.R. // Chem. Commun. 2009. P. 2446–2462. <https://doi.org/10.1039/b816852k>

Formation of Various Antimicrobial Peptide Emericellipsin Isoforms in *Emericellopsis alkalina* under Different Cultivation Conditions

A. E. Kuvarina^{a,*}, M. A. Sukonnikov^a, E. A. Rogozhin^{a,b}, M. V. Serebryakova^c,
A. V. Timofeeva^c, M. L. Georgieva^{a,d}, and V. S. Sadykova^{a,**}

^a Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

^c Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^d Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

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

**e-mail: sadykova_09@mail.ru

A microbiological screening of the target component of emericellipsin A of the *Emericellopsis alkalina* E101 strain was carried out in various biotechnological systems at various pH. The content of emericellipsin A was quantified under these conditions. It has been established that the new approved membrane-liquid cultivation method at pH 10 contributes to an increase in the yield of the main component of emericellipsin A. It was shown that the new method of cultivating the strain *E. alkalina* E101 also promotes the synthesis of various isoforms of the main component of emericellipsin A. Some comparative analysis of them was carried out.

Keywords: antibiotics, *Emericellopsis alkalina*, emericellipsin A, isoforms of emericellipsin A

УДК 577.15

СИНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АРАБИНАЗ РАЗНОГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ ПРИ БИОКОНВЕРСИИ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА И ЯБЛОЧНЫХ ВЫЖИМОК

© 2023 г. М. В. Семенова^{1, *}, М. С. Курьшкина², А. П. Сеницын^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: marg@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 30.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Изучено взаимодействие эндоарабиназы (**эндоА**) с ферментами экзо-типа действия при совместном гидролизе разветвленного арабинана (**РАра**), свекловичного жома (**СЖ**) и яблочных выжимок (**ЯВ**). Показано, что при гидролизе РАра наиболее эффективными были смеси эндоА с арабинофуранозидазой (**АФ**) или арабиноксилан-арабинофурангидролазой (**АКГ**) с содержанием эндоА 20 и 40% соответственно. В результате оптимизации комплекса арабиназ, целлюлаз и пектиназы осуществлен практически полный гидролиз ЯВ в моносахариды (арабинозу, глюкозу, фруктозу). При гидролизе СЖ степень конверсии гемицеллюлозы (арабинана) составила более 50%, целлюлозы – 75%.

Ключевые слова: эндоарабиназа, экзоарабиназа, арабинофуранозидаза, арабиноксилан-арабинофурангидролаза, синергизм, свекловичный жом, яблочные выжимки

DOI: 10.31857/S0555109923020137, **EDN:** LVJIXD

Из-за разнообразия содержащих арабинозу полисахаридов в пектине и клеточной стенке растений большую роль в деградации растительного материала играют ферменты, высвобождающие арабинозу (арабиназы). Эти ферменты можно разделить на четыре класса. Эндоарабиназа (**эндоА**, КФ 3.2.1.99, 43 семья гликозил-гидролаз) катализирует расщепление внутренних α -(1 → 5)-гликозидных связей арабинана с образованием α -L-арабинофуранозы и арабиноолигосахаридов. Фермент наиболее эффективен при гидролизе таких субстратов, как незамещенных арабинанов. Экзоарабиназы (**экзоА**, 93 семья гликозил-гидролаз) катализируют отщепление концевых остатков или коротких арабиноолигосахаридов от цепи арабинана на невозстанавливаемом конце. Типичными представителями экзоА являются α -L-арабинофуранозидазы (**АФ**, КФ 3.2.1.55, 51 и 54 семьи гликозил-гидролаз). Можно выделить два типа АФ: тип А и тип В. Первый тип не активен в отношении полисахаридов и катализирует гидролиз только олигосахаридов, а второй активен по отношению к обоим субстратам. Существуют также АФ, имеющие в своей структуре ксилан-связывающий домен, способные эффективно гидролизовать расщепление α -гликозидных связей как в арабинанах, так и в арабиноксиланах – арабиноксилан-арабинофурангидролазы (**АКГ**).

Арабинаны (как правило, разветвленные) обнаружены в клеточных стенках плодов яблони (составляют до 27% от общего количества пектиновых веществ), сахарной свеклы (46%), сои (60%) и других растений [1, 2].

Хорошим источником арабинанов является свекловичный жом (**СЖ**). СЖ является побочным продуктом переработки сахарной свеклы и, как правило, используется в животноводстве как ценный и дешевый корм. СЖ представляет собой стружку толщиной не более 2 мм с влажностью не более 82%, из которой диффузионным способом извлечено основное количество сахара – после этого в СЖ остается 18–23% сухих веществ, ~80% которых полисахариды, включающие 22–24% (от сухого вещества) целлюлозы, 24–32% гемицеллюлозы (преимущественно арабинана), 9–11% пектиновых веществ, среди которых преобладают растворимые пектины. В небольших количествах содержатся также белок (8–11%), жиры (1–2%) и лигнин (3–6%) [3].

Яблочные выжимки (**ЯВ**) являются вторичным продуктом при производстве сока. В ЯВ содержится ~20% сухих веществ, из которых на долю целлюлозы приходится 21–23% (от сухого вещества), гемицеллюлозы составляют 6–7% (с сопоставимым содержанием арабинана, ксилана и галактана), 15–32% пектиновых веществ. Стоит отметить так-

же высокое содержание лигнина (20–22%). В небольших количествах содержатся также белок (3–4%) и жиры (2–3%) [4].

Цель работы – изучение взаимодействия арабиназ разных типов действия при гидролизе арабино-содержащих субстратов и подбор оптимального комплекса ферментов, состоящего из гемицеллюлаз (арабиназ), целлюлаз и пектиназ, для гидролиза растительного сырья с получением моносахаридов.

МЕТОДИКА

Штаммы и ферментные препараты. В работе были использованы штаммы гриба *Penicillium canescens* – продуценты рекомбинантных эндоА *Aspergillus niger* (штамм РСА-эндоА, [5]), экзоА *P. canescens* (РСА-экзоА, [6]), АКГ *P. canescens* (РСА-АКГ, [7]), АФ *P. canescens* (АФ Рс, РСА-АФ, [7]), пектинлиазы А (ПЛ) *P. canescens* (РСА-ПЛ, [8]), штаммы гриба *P. verruculosum* В1-537 [9, 10] и F10 [11] – продуценты целлюлаз (целлобиогидролазы I, ЦБГ) и эндоглюканазы II, ЭГ) и рекомбинантной β-глюкозидазы (БГ) *A. niger* соответственно, а также штамм гриба *A. foetidus* 70a (Af-70a) [12] – продуцент АФ *A. foetidus* (АФ Af).

Ферментные препараты (ФП) были получены путем лиофильного высушивания КЖ штаммов на лиофильной сушке Benchtop 6K ES (“SP Scientific/Virtis”, США).

Гомогенные ферменты были выделены из перечисленных выше ФП по методикам, описанным в работах [5–11]. Выделение АФ Af описано в настоящей работе.

Реагенты. Для создания буферных смесей использовали реактивы фирм “Bio-Rad” (США), “Panreac” (Германия), “Helicon” и “Реахим” (Россия).

Для определения активностей ферментов в качестве субстратов использовали арабинаны линейный (ЛАра) и разветвленный (РАра) из сахарной свеклы – все “Megazyme” (Австралия); Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), цитрусовый пектин со степенью этерификации около 70%, *n*-нитрофенил-α-арабинофуранозид (пНФАФ), *n*-нитрофенил-β-глюкопиранозид (пНФГл) – “Sigma” (США); микрокристаллическую целлюлозу (ТУ 20.16.59-001-40693384-209) производства “Кристалл” (Россия).

При ферментативном гидролизе в качестве субстратов использовали РАра, СЖ и ЯВ.

Сухой СЖ (“Агрин”, Россия) был измельчен до частиц 0.5–1.0 мм на мельнице MF10 basic (“IKA Werke”, Германия). ЯВ (содержание сухих веществ 17%) были получены перетиранием плодов яблок сорта “Мельба” на бытовой шнековой соковыжималке (“Scarlett”, Россия) с отделением сока.

Определение активностей ФП. За 1 ед. активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активности по отношению к полисахаридным субстратам (концентрация 5 г/л в реакционной смеси) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при рН 5.0 и 50°C методом Шомоди–Нельсона [13].

Активности по отношению к *n*-нитрофенильным производным сахаров (0.9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола при рН 5.0 и 50°C [13].

Лиазную активность определяли по изменению оптической плотности при 232 нм, регистрирующей накопление 4,5-ненасыщенного продукта трансэлиминирования пектина [14].

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта. Концентрацию гомогенных ферментов оценивали по оптической плотности при 280 нм, используя рассчитанные по аминокислотной последовательности коэффициенты экстинкции.

Электрофорез в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС (ЭФ-ПААГ) проводили на приборе MiniProtein (“Bio-Rad”, США) согласно руководству к прибору. Содержание отдельных белков в ФП оценивалось методом денситометрии.

Биоконверсия растительного сырья. Биоконверсию субстратов проводили под действием гомогенных ферментов или их смесей, при суммарном содержании белка 0.1 при гидролизе РАра и 2 мг/г субстрата при гидролизе СЖ и ЯВ или 0.001 и 0.2 мг/мл реакционной смеси соответственно. Гидролиз проводили в пластиковых пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере Biosan TS-100 (“Biosan”, Латвия) в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампициллина (РУП “Белмедпрепараты”, Республика Беларусь) при рН 5.0 и 40°C. Концентрация субстрата составляла 10 (в случае РАра) или 100 г/л (в случае СЖ и ЯВ) в пересчете на сухое вещество.

В ходе гидролиза отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС (методом Шомоди–Нельсона). Качественный и количественный состав низкомолекулярных сахаров определяли с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 (“Agilent”, США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм, 4.0 × 250 мм). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил–вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10–100 мкл.

Глубину гидролиза субстратов рассчитывали исходя из содержания в них полисахаридов [3, 4]. Величину коэффициента синергизма (КС) рассчитывали как отношение экспериментально полученного значения концентрации продукта гидролиза (ВС) при совместном действии ферментов

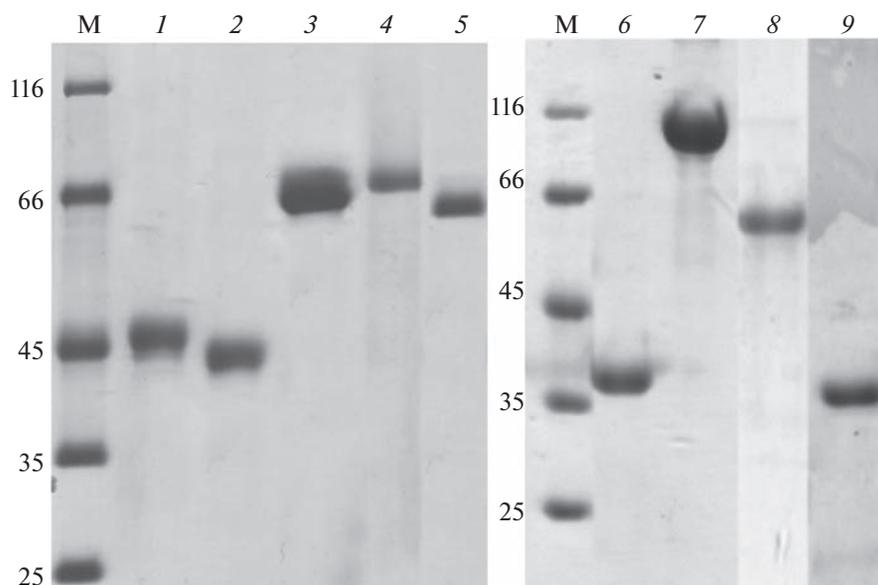


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС очищенных ферментов: 1 – экзоА, 2 – эндоА, 3 – АФ *Af*, 4 – АКГ, 5 – АФ *Pc*, 6 – ЭГ, 7 – БГ, 8 – ЦБГ, 9 – ПЛ. М-маркеры, указаны молекулярные массы стандартных белков.

к теоретически рассчитанному, последнее определяли как сумму концентраций ВС, полученных при действии отдельных ферментов с учетом доли каждого фермента в смеси.

Очистка АФ *Af* хроматографическими методами.

Получение гомогенного фермента проводили с помощью жидкостной хроматографической системы NGC Chromatography Systems (“Bio-Rad”, США) со спектрофотометрическим детектором. На первой стадии ФП (10 мг белка) наносили на анионообменную колонку Source 15Q (“Pharmacia”, Швеция), уравновешенную 0.02 М бис-трис-НСI буфером с рН 6.8. Связавшиеся с сорбентом белки элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 0.4 М со скоростью 1 мл/мин.

На следующем этапе очистки использовали гидрофобную хроматографию на колонке Source 15 Isoproryl (объем 1 мл, “Pharmacia”, Швеция). Во фракцию, содержащую исследуемый фермент, добавляли при перемешивании сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 1.7 М. Затем образец наносили на колонку, уравновешенную 0.02 М Na-ацетатным буфером, содержащим 1.7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Элюцию проводили в обратном градиенте концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1.7 до 0 М со скоростью 1 мл/мин.

Для дальнейшей работы фракции, содержащие очищенные белки, обессоливали на колонке с биогелем P4, уравновешенной 0.05 М Na-ацетатным буфером с рН 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка ферментов и анализ их специфичности.

Выделение эндоА, экзоА, АКГ, АФ *Pc*, ПЛ, ЦБГ,

ЭГ и БГ из соответствующих ФП проводили согласно методикам, описанным в работах [5–11]. Для очистки АФ *Af* использовали двухстадийную схему, включающую анионообменную с последующей гидрофобной хроматографией. На первой стадии фракция, содержащая АФ *Af*, была собрана при концентрации NaCl 0.2 М, на второй стадии – при 0.7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Во всех случаях гомогенность очищенных белков составляла более 90% согласно данным ЭФ-ПААГ (рис. 1). Их идентификация была осуществлена на основании результатов масс-спектрометрического анализа трипсиновых гидролизатов [15]. Активности очищенных ферментов к ряду субстратов представлены в табл. 1.

ЭндоА обладала высокой активностью при использовании в качестве субстрата ЛАра (52 ед./мг) и низкой при использовании РАра (4 ед./мг). ЭкзоА проявляла высокую активность по отношению к ЛАра (117 ед./мг) и крайне низкую к РАра (5 ед./мг) и пНФАФ (0.3 ед./мг). В отличие от эндоА и эк-

Таблица 1. Активности очищенных ферментов (ед./мг белка), использованных для создания комплекса

Фермент	Субстрат		
	ЛАра	РАра	пНФАФ
ЭндоА	52 ± 3	4.1 ± 0.2	0
ЭкзоА	117 ± 9	5.0 ± 0.4	0.31 ± 0.01
АКГ	3.8 ± 0.2	28 ± 2	13 ± 1
АФ <i>Pc</i>	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	16 ± 1
АФ <i>Af</i>	0.61 ± 0.03	11 ± 1	18 ± 2

Таблица 2. Концентрация ВС (г/л) и КС после 24 ч гидролиза РАра смесями эндо- и экзоарабиназ

Фермент экзо-типа действия	Содержание эндоА, %	Концентрация ВС	КС
нет	100	0.41 ± 0.02	–
ЭкзоА	80	0.69 ± 0.03	1.4
	60	0.92 ± 0.04	1.6
	40	0.81 ± 0.03	1.3
	20	0.75 ± 0.03	1.1
	нет	0.79 ± 0.04	–
АКГ	80	1.6 ± 0.1	1.9
	60	3.2 ± 0.2	2.5
	40	4.8 ± 0.3	2.8
	20	4.2 ± 0.3	1.9
	нет	2.6 ± 0.2	–
АФ Рс	80	0.65 ± 0.04	1.5
	60	0.85 ± 0.06	1.9
	40	0.86 ± 0.05	1.8
	20	0.90 ± 0.07	1.8
	нет	0.51 ± 0.02	–
АФ Аf	80	0.95 ± 0.07	1.6
	60	1.5 ± 0.1	1.9
	40	2.0 ± 0.2	2.0
	20	2.7 ± 0.2	2.2
	нет	1.4 ± 0.1	–

зоА АКГ, АФ Рс и АФ Аf проявляли крайне низкую активность к ЛАра, обладая при этом высокой активностью к РАра и/или к пНФАФ: активности АКГ к РАра и к пНФАФ составляли 28 и 13 ед./мг соответственно, активности АФ Рс и АФ Аf по отношению к РАра – 2 и 11 ед./мг соответственно, к пНФАФ – 16–18 ед./мг. На основе данных о субстратной специфичности и результатов масс-спектрометрического анализа АФ Рс была отнесена к типу А, АФ Аf – к типу В.

Изучение синергизма при гидролизе РАра под действием арабиназ. Было изучено синергетическое взаимодействие между эндоА и ферментами экзо-типа действия: экзоА, АФ Аf, АФ Рс и АКГ. Для этого подготовлены смеси ферментов, в которых доля эндоА составляла 20, 40, 60 или 80%. С помощью этих смесей, а также индивидуальными ферментами был проведен гидролиз РАра (исходная концентрация 10 г/л). В табл. 2 представлены концентрация ВС после 24 ч гидролиза и значения КС.

Индивидуальная эндоА практически не гидролизвала РАра: концентрация ВС после 24 ч гид-

ролиза составила 0.4 г/л. Также невысокая концентрация ВС (менее 1 г/л) наблюдалась при действии индивидуальных экзоА и АФ Рс, а также их смесей с эндоА. Наибольшую концентрацию ВС (4.8 г/л) наблюдали для смеси эндоА и АКГ при содержании ферментов 40 и 60% соответственно. При этом рассчитанное значение КС составило 2.8. Менее эффективной оказалась смесь эндоА с АФ Аf при содержании ферментов 20 и 80% соответственно: концентрация ВС и значение КС составили 2.7 г/л и 2.2 соответственно. Следует отметить, что индивидуальные АКГ и АФ Аf были способны активно гидролизовать РАра: после 24 ч гидролиза концентрация ВС составила 2.6 и 1.4 г/л соответственно, в обоих случаях единственным продуктом гидролиза была арабиноза.

Таким образом увеличить доступность основной цепи арабинана для эндоА могли только АКГ и АФ Аf – ферменты, обладающие способностью не только гидролизовать олигомерные субстраты, но и отщеплять боковые заместители в РАра. Так как смеси эндоА с экзоА или АФ Рс были малоэффективны, далее они не рассматривались как воз-

Таблица 3. Концентрация ВС, моносахаридов (г/л) и КС после 48 ч гидролиза ЯВ и СЖ смесями очищенных ферментов

Фермент	ВС	Арабиноза	Фруктоза	Глюкоза	КС
ЯВ					
Сахара ЯВ	50 ± 4	0	35 ± 3	14 ± 1	–
ЭндоА	54 ± 5	0	39 ± 3	15 ± 2	–
АФ <i>Af</i>	65 ± 6	0.68 ± 0.07	46 ± 3	18 ± 2	–
АКГ	54 ± 5	0.93 ± 0.08	37 ± 4	16 ± 2	–
ЭндоА + АФ <i>Af</i>	93 ± 7	3.4 ± 0.3	65 ± 5	25 ± 3	1.5
ЭндоА + АКГ	62 ± 6	1.9 ± 0.2	42 ± 4	18 ± 2	1.1
Ц	64 ± 6	0	44 ± 4	21 ± 2	–
ПЛ	54 ± 4	0.11 ± 0.01	39 ± 3	14 ± 1	–
Ц + ПЛ (1 : 1)	64 ± 5	0.09 ± 0.01	46 ± 3	17 ± 2	1.1
Ц + ПЛ (9 : 1)	82 ± 6	0	53 ± 4	29 ± 3	1.3
Смесь А1	105 ± 9	3.2 ± 0.2	67 ± 5	31 ± 2	1.5
Смесь А2	89 ± 5	2.4 ± 0.2	58 ± 4	27 ± 2	1.2
Смесь А3	100 ± 8	2.4 ± 0.3	65 ± 5	32 ± 3	1.6
Смесь А4	95 ± 7	2.0 ± 0.1	61 ± 4	31 ± 2	1.5
СЖ					
Сахара СЖ	0.96 ± 0.06	0	0.31 ± 0.02	0.42 ± 0.03	–
ЭндоА	6.4 ± 0.4	0.71 ± 0.07	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2	–
АФ <i>Af</i>	6.5 ± 0.4	0.69 ± 0.07	2.8 ± 0.3	3.0 ± 0.3	–
АКГ	6.7 ± 0.5	1.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.2	–
ЭндоА + АФ <i>Af</i>	9.1 ± 0.7	2.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	1.4
ЭндоА + АКГ	9.6 ± 0.6	2.4 ± 0.2	2.8 ± 0.3	4.3 ± 0.4	1.5
Ц	9.6 ± 0.7	0.08 ± 0.01	2.4 ± 0.2	6.3 ± 0.5	–
ПЛ	7.5 ± 0.7	1.9 ± 0.2	0.37 ± 0.03	0.78 ± 0.06	–
Ц + ПЛ (1 : 1)	17 ± 1	2.9 ± 0.3	0.89 ± 0.07	11 ± 1	2.0
Ц + ПЛ (9 : 1)	13 ± 1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	9.2 ± 0.8	1.4
Смесь А1	20 ± 2	5.7 ± 0.4	1.9 ± 0.1	10.5 ± 0.8	2.2
Смесь А2	18 ± 2	4.6 ± 0.3	1.4 ± 0.1	7.9 ± 5	2.0
Смесь А3	21 ± 2	6.2 ± 0.4	2.9 ± 0.2	12 ± 1	2.2
Смесь А4	20 ± 2	6.1 ± 0.4	2.6 ± 0.2	9.9 ± 0.7	2.1

можный компонент оптимального ферментного комплекса.

Подбор ферментов для гидролиза ЯВ. Следует отметить, что содержание ВС в исходных ЯВ было высоким – 50 г/л (при исходной концентрации субстрата в реакционной смеси 100 г/л по сухой массе). При этом основными сахарами были фруктоза и глюкоза: 35 и 14 г/л соответственно.

В соответствии с полученными результатами среди экзоарабиназ были выбраны наиболее активные ферменты и оптимальное соотношение ферментов эндо- и экзо-типов – это смеси эндоА + АФ *Af* (в соотношении 20 : 80) и эндоА + АКГ (40 : 60). Был проведён гидролиз ЯВ (табл. 3) в те-

чение 48 ч индивидуальными ферментами и подобранными смесями.

Можно однозначно выделить АФ *Af* как наиболее эффективный фермент при гидролизе ЯВ. Концентрация ВС после 48 ч гидролиза в присутствии только этого фермента АФ *Af* составила 65 г/л, а в присутствии смеси эндоА + АФ *Af* – 93 г/л (КС 1.5). Основными продуктами гидролиза были фруктоза и глюкоза (65 и 25 г/л соответственно), а также присутствовала арабиноза (3.4 г/л). Гидролиз в присутствии АКГ и ее смеси с эндоА по выходу ВС уступал даже АФ *Af*.

Для эффективного гидролиза растительного сырья ферментная смесь должна содержать целлюлазы ЦБГ, ЭГ, БГ в оптимальном соотношении,

Таблица 4. Состав смесей очищенных ферментов

Смесь ферментов	Содержание фермента, %				
	ЭндоА	АФ Af	АКГ	Ц	ПЛ
A1	4	16	–	70	10
A2	8	32	–	50	10
A3	8	–	12	70	10
A4	16	–	24	50	10

обеспечивающем наибольшую скорость превращения субстрата в нужные продукты [16]. В работе были использованы очищенные ЦБГ (активность по отношению к МКЦ 0.65 ед./мг), ЭГ (активность по отношению к КМЦ 33 ед./мг) из *P. verruculosum* как ключевые ферменты целлюлазного комплекса гриба, выделенные из ФП В1-537 по методикам, описанным в работах [9, 10], а также БГ *A. niger* (активность по отношению к п-НФГл 105 ед./мг), выделенная из ФП F10 по методике [11]. Оптимальное соотношение между ЦБГ и ЭГ составляло 4 : 1, как было показано в работе [16]. Для устранения ингибирования ЦБГ продуктом реакции (целлобиозой) в реакционную смесь вносили БГ в соотношении ЦБГ : БГ 9 : 1 [10]. В итоге была использована смесь целлюлаз, обозначаемая далее как Ц, содержащая ЦБГ, ЭГ, БГ в отношении 7 : 2 : 1 соответственно.

Присутствие пектина является важным фактором, затрудняющим ферментативную переработку растительного сырья, так как даже относительно небольшое его содержание обуславливает высокую вязкость раствора. В качестве пектиназы был использован фермент ПЛ *P. canescens* (активность по отношению к пектину 19 ед./мг), выделение которого проводили по методике [8].

Гидролиз ЯВ проводили как отдельными ферментами (Ц и ПЛ), так и их смесями с соотношением компонентов по концентрации белка 1 : 1 и 9 : 1 соответственно. Соотношения были выбраны исходя из предположительного состава субстратов и уровня специфических активностей ферментов. Результаты представлены в табл. 3. Наиболее эффективной была смесь Ц + ПЛ с большим содержанием целлюлазного комплекса (соотношение Ц : ПЛ 9 : 1): после 48 ч гидролиза концентрация ВС составила 82 г/л, КС – 1.3, среди продуктов преобладали фруктоза и глюкоза 53 и 29 г/л соответственно.

На основании полученных результатов были составлены комплексы ферментов А1–А4, содержащие арабиназы, целлюлазы и пектиназу (табл. 4), для проведения гидролиза ЯВ (табл. 3). Смеси А1 и А3 с увеличенным содержанием Ц (70% от общего белка) были более эффективны, чем смеси А2 и А4 с содержанием Ц 50%. Наибольшая концентрация ВС (105 г/л) после 48 ч гидролиза ЯВ

была получена при использовании смеси А1 с АФ Af. Продуктами гидролиза были арабиноза (3.2 г/л), фруктоза (67 г/л) и глюкоза (31 г/л).

Для всех смесей (А1–А4) значения КС, характеризующего взаимодействие целлюлазного, пектиназного и арабиназного комплексов, были больше 1, в пределах 1.2–1.6, что свидетельствует о присутствии положительного синергетического эффекта.

Подбор ферментов для гидролиза СЖ. Содержание ВС в исходном СЖ было невысоким около 1 г/л при исходной концентрации субстрата 100 г/л. При гидролизе СЖ эффективность индивидуальных арабиназ была примерно одинакова с небольшим преимуществом АКГ: концентрация ВС после 48 ч гидролиза составила 6.4–6.7 г/л, основными сахарами были фруктоза (2.4–2.8 г/л), глюкоза (2.5–3.0 г/л), арабиноза (0.7–1.1 г/л) (табл. 3).

При гидролизе СЖ смесями эндоА + АФ Af или эндоА + АКГ во всех случаях наблюдалось синергетическое взаимодействие между ферментами эндо- и экзо-типа действия, значения КС составили 1.4 и 1.5 соответственно. Использование смесей ферментов при гидролизе СЖ по сравнению с действием отдельных ферментов привело к увеличению концентрации ВС на 2.5–3 г/л в основном за счет увеличения выхода арабинозы (табл. 3). Разница между выходом продуктов при использовании смеси эндоА + АФ Af или эндоА + АКГ была незначительной.

При гидролизе СЖ в присутствии смесей Ц + ПЛ более эффективной оказалась смесь с равным содержанием Ц и ПЛ: после 48 ч гидролиза концентрация ВС составила 17 г/л, КС – 2.0, а среди продуктов преобладала глюкоза (11 г/л).

Из комплексов ферментов А1–А4, составленных из арабиназ, целлюлаз и пектиназы, смеси А1 и А3 с увеличенным содержанием Ц (70% от общего белка) были более эффективны, чем смеси А2 и А4 с 50%-ным содержанием Ц, что отражалось, в основном, на увеличении выхода глюкозы. Разница между смесями А1 с АФ Af и А3 с АКГ была незначительной: концентрация ВС после 48 ч гидролиза СЖ составила 20–21 г/л, продуктами гидролиза были арабиноза (около 6 г/л), глюкоза (11–12 г/л) и фруктоза (2–3 г/л).

Значение КС для всех смесей (А1–А4) составило 2.0–2.2, что свидетельствовало о присутствии значительно более выраженного синергетического эффекта между целлюлазами, пектиназой и арабиназами при гидролизе СЖ, чем при гидролизе ЯВ.

Гидролиз ЯВ и СЖ ферментными препаратами. На основе полученных результатов были сформированы комплексы ФП с преимущественным содержанием одного рекомбинантного фермента: РСА-эндоА (содержание эндоА от общего белка 22%), РСА-АКГ (29% АКГ), Af-70a (12% АФ Af),

Таблица 5. Состав комплексов ФП

Смесь ферментов	Содержание ФП, %					
	РСА-эндоА	Af-70a	РСА-АКГ	В1-537	F10	РСА-ПЛ
A1	4	16	–	63	7	10
A3	8	–	12	63	7	10

Таблица 6. Концентрация ВС и моносахаридов (г/л) после 48 ч гидролиза ЯВ и СЖ комплексами ФП

ФП	ВС	Арабиноза	Фруктоза	Глюкоза
ЯВ				
Сахара ЯВ	50 ± 4	0	35 ± 3	14 ± 1
РСА-эндоА	75 ± 5	2.0 ± 0.1	53 ± 4	18 ± 2
Af-70a	77 ± 6	2.9 ± 0.3	52 ± 3	20 ± 2
РСА-АКГ	77 ± 5	2.8 ± 0.08	54 ± 4	18 ± 2
В1-537 + F10	84 ± 6	0	55 ± 4	26 ± 3
РСА-ПЛ	81 ± 4	0.81 ± 0.07	58 ± 3	21 ± 1
В1-537 + F10 + РСА-ПЛ	90 ± 5	0.32 ± 0.02	64 ± 3	25 ± 2
Смесь ФП А1	106 ± 9	3.6 ± 0.4	73 ± 6	28 ± 2
Смесь ФП А3	106 ± 8	3.4 ± 0.3	74 ± 6	27 ± 3
СЖ				
Сахара СЖ	0.96 ± 0.06	0	0.31 ± 0.02	0.42 ± 0.03
РСА-эндоА	25 ± 2	10 ± 1	5.3 ± 0.5	8.1 ± 0.7
Af-70a	29 ± 2	12 ± 1	5.0 ± 0.3	11 ± 1
РСА-АКГ	34 ± 3	14 ± 1	5.6 ± 0.4	12 ± 1
В1-537 + F10	21 ± 2	1.6 ± 0.2	4.3 ± 0.4	14 ± 1
РСА-ПЛ	23 ± 2	7.8 ± 0.9	5.0 ± 0.4	7.1 ± 0.3
В1-537 + F10 + РСА-ПЛ	24 ± 2	1.9 ± 0.3	4.7 ± 0.4	14 ± 1
Смесь ФП А1	38 ± 3	14 ± 1	6.2 ± 0.4	18 ± 1
Смесь ФП А3	39 ± 3	15 ± 1	6.0 ± 0.5	18 ± 1

РСА-ПЛ (47% ПЛ), В1-537 (ЦБГ 50%, ЭГ 17%), F10 (70% БГ).

Проводился гидролиз как индивидуальными ФП, так и их смесями, составленными в соответствии с наилучшими по составу смесями очищенных ферментов А1 и А3 (ФП А1 и ФП А3 соответственно) (табл. 5). ФП и их смеси дозировали, уравнивая по содержанию белка в реакционной среде – 5 мг/г субстрата. В табл. 6 представлены результаты гидролиза ЯВ и СЖ.

При гидролизе ЯВ наибольший выход продуктов наблюдался для индивидуальных ФП целлюлаз (В1-537 + F10) и пектиназы (РСА-ПЛ), а также их смеси (В1-537 + F10 + РСА-ПЛ): концентрация ВС после 48 ч гидролиза составляла 81–90 г/л с преимущественным содержанием фруктозы (55–64 г/л) и глюкозы (21–26 г/л). Индивидуальные ФП арабиназ давали около 75–77 г/л ВС с преимущественным содержанием фруктозы (52–54 г/л) и

глюкозы (18–20 г/л), а также арабинозы – 2.0–2.9 г/л.

Смеси ФП А1 и ФП А3, включающие полный комплекс ФП целлюлаз, пектиназы и арабиназ, но содержащие разные ФП экзоарабиназ, были одинаково эффективны: после 48 ч концентрация ВС составляла 106 г/л, среди моносахаров основной была фруктоза (73–74 г/л), накапливались также глюкоза (27–28 г/л) и небольшое количество арабинозы (3.4–3.6 г/л). При этом наблюдался почти полный гидролиз ЯВ.

Таким образом, использование комплекса ФП целлюлаз, пектиназы и арабиназ при гидролизе ЯВ позволило увеличить выход всех основных моносахаридов (фруктозы, глюкозы, арабинозы) по сравнению с проведением гидролиза только целлюлазами или арабиназами.

При гидролизе СЖ индивидуальные ФП арабиназ были более активными, чем ФП целлюлаз и/или пектиназы. Наибольшая концентрация ВС

после 48 ч гидролиза наблюдалась в случае ФП РСА-АКГ и составляла 34 г/л, основными продуктами были арабиноза и глюкоза – 14 и 12 г/л соответственно. При действии только ФП Af-70a или РСА-эндоА выход продуктов гидролиза был немного ниже: концентрация ВС составляла 25–29 г/л, арабинозы – 10–12 г/л, глюкозы – 8–11 г/л.

Смеси ФП А1 и ФП А3 были одинаково эффективны при гидролизе СЖ: концентрация ВС после 48 ч составляла 38–39 г/л, арабинозы – 14–15 г/л, глюкозы 18 г/л, фруктозы – около 6 г/л. Таким образом, использование комплекса ФП целлюлаз, пектиназы и арабиназ при гидролизе СЖ также позволило увеличить выход всех основных моносахаридов относительно действия только ФП целлюлаз или арабиназ.

* * *

Для осуществления полного гидролиза сложных по составу полисахаридных субстратов используется оптимально подобранный с учетом особенностей структуры субстрата ферментативный комплекс. Ценным для получения сахаров сырьем являются растительные отходы пищевой промышленности и сельского хозяйства, такие как ЯВ и СЖ. Ферментативные гидролизаты этих субстратов содержат пентозы (арабинозу, ксилозу) и гексозы (глюкозу, фруктозу), которые могут использоваться для получения этанола [17, 18], молочной кислоты [19] и других продуктов с помощью микроорганизмов. В работе [20] была показана успешная двухстадийная конверсия гидролизата СЖ в этанол дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* (была утилизирована глюкоза) с последующим получением молочной кислоты из пентоз в присутствии *Lactobacillus plantarum*.

Для получения гидролизатов ЯВ и СЖ с высоким содержанием моносахаридов использовали ФП целлюлаз, пектиназ, ксиланаз [18–21]. ЯВ исходно содержат большое количество растворимых сахаров (глюкоза, фруктоза), поэтому после ферментативного гидролиза ЯВ выход конечных продуктов (ВС, моносахаридов) высок и составляет, как правило, 60–90% от сухой массы [18, 21]. В то же время яблочный жом, получаемый после отмывки ЯВ от растворимых сахаров, является менее реакционно способным и степень его конверсии значительно ниже: в работе [19] из 39 кг жома путем обработки комплексом пектиназ и целлюлаз было получено 4.66 кг растворимых сахаров.

В настоящей работе подбор ферментного комплекса на основе очищенных ферментов позволил осуществить полный гидролиз ЯВ до растворимых сахаров: из 100 г/л (по сухому весу) ЯВ было получено 106 г/л ВС, из которых 50 г/л ВС (≈50%) соответствовали присутствующим в субстрате раство-

римым сахарам ЯВ, а 56 г/л ВС получали за счет ферментативного гидролиза нерастворимых полисахаридов ЯВ.

Ранее [22] нами был описан полный гидролиз СЖ в присутствии 12 очищенных ферментов различной специфичности. В настоящей работе более подробно изучено взаимодействие эндо- и экзоарабиназ при их гидролизе арабинана из СЖ, был определен оптимальный качественный (эндоА + АФ А/или эндоА + АКГ) и количественный состав (соотношение ферментов эндо- и экзо-типа действия) арабинового комплекса, что позволило упростить состав комплекса используемых ферментов. Концентрация арабинозы и глюкозы достигала 15–18 г/л каждой. С учетом того, что содержание гемицеллюлозы и целлюлозы в СЖ составляло 24–32 и 22–24% соответственно [3], конверсия полисахаридов в моносахариды составляла не менее 50 и 75%.

Высокие значения КС при использовании смесей очищенных ферментов разной субстратной специфичности свидетельствуют о необходимости присутствия всех ферментов в реакционной среде. Так для смеси целлюлаз и пектиназы КС составил 1.3 при гидролизе ЯВ и 2.0 при гидролизе СЖ, а при добавлении также арабиназ – 1.5 и 2.2 соответственно.

Работа была выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Регистрационный номер Государственного Задания 122041100066-7).

Авторы благодарят сотрудников ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Handbook of Food Enzymology. / Eds. J.R. Whitaker, A.G. Voragen, D.W.S. Wong. N.Y., Basel: Marcel Dekker. 2003. P. 832–833.
2. Hemicellulose and Hemicellulases. / Eds. M.P. Coughlan, G.P. Hazlewood. London and Chapel Hill: Portland Press Research Monograph. 1993. P. 65–69.
3. San R., Hughes S. // Carbohydrate Polymers. 1998. V. 36. P. 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00255-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00255-5)
4. Parmar I., Rupasinghe V.H.P. // Biores. Technol. 2013. V. 130. P. 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.084>
5. Рубцова Е.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Короткова О.Г., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 5. С. 502–510. <https://doi.org/10.7868/S0555109915050141>
6. Семенова М.В., Волков П.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 375–384. <https://doi.org/10.7868/S0555109918040062>
7. Сеницына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П.,

- Синицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494–1505.
<https://doi.org/10.1023/b:biry.0000009134.48246.7e>
8. Синицына О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В., Гусakov А.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М. и др. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 5. С. 699–706.
 9. Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М. // Биотехнология. 2021. Т. 36. № 6. С. 24–41.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-24-41>
 10. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880.
<https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
 11. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. // *Process Biochem.* 2015. V. 50. P. 1258–1263.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
 12. Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Кошелев А.В., Вельков В.В., Окунев О.Н., Бравова Г.Б. и др. // Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. М.: Пищепромиздат, 2004. С. 33.
 13. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусakov А.В. // Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
 14. Collmer A., Reid J.L., Mount M.S. // *Methods in Enzymol.* / Ed. D.L. Purich. San Diego: Academic Press, 1988. P. 329–335.
 15. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. P. 1446–1461.
<https://doi.org/10.1134/S1061934810140030>
 16. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Shashkov I., Sinitsyn A.P. // *Biotech.* 2018. V. 8. P. 396–399.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1419-4>
 17. Патент РФ. 2008. №RU2391402C2.
 18. Семенова М.В., Зоров И.Н., Синицын А.П., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Щербаков С.С. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2009. № 4. С. 72–74.
 19. Noro S., Takahashi T., Ichita J., Muranaka Y., Kato Y. // *Transactions of the Materials Research Society of Japan.* 2008. V. 33. № 4. P. 1173–1175.
<https://doi.org/10.14723/tmrjs.33.1173>
 20. Diaz A.B., Marzo C., Caro I., de Ory I., Blandino A. // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 225. P. 225–233.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.024>
 21. Gama I R., Van Dyk J.S., Pletschke B.I. // *Biotech.* 2015. V. 5. P. 1075–1087.
<https://doi.org/10.1007/s13205-015-0312-7>
 22. Семенова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сатрудинов А.Д., Синицына О.А., Рубцова Е.А. и др. // Прикл. биохим. и микробиол. 2019. Т. 55. № 6. С. 586–593.
<https://doi.org/10.1134/S0555109919050118>

Synergistic Interaction of Arabinases of Different Types of Action in the Bioconversion of Sugar Beet Pulp and Apple Pomace

M. V. Semenova^{a, *}, M. S. Kuryshkina^b, and A. P. Sinitsyn^{a, b}

^a Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: margs@mail.ru

The interaction of endoarabinase (endoA) with exo-type enzymes was studied during their joint hydrolysis of branched arabinane (BAra), sugar beet pulp (SBP) and apple pomace (AP). It was shown that mixtures of endoA with arabinofuranosidase (AF) or arabinoxylan-arabinofuranhydrolase (AXH) with endoA content of 20 and 40%, respectively, were the most effective in the hydrolysis of BAra. As a result of the optimization of the complex of arabinases, cellulases and pectinase, almost complete conversion of AP into monosaccharides (arabinose, glucose, fructose) was carried out. During the hydrolysis of SBP, the conversion rate of hemicellulose (arabinane) was more than 50%, cellulose – 75%.

Keywords: endoarabinase, exoarabinase, arabinofuranosidase, arabinoxylan-arabinofuranhydrolase, synergism, sugar beet pulp, apple pomace

УДК 579.66, 579.222.4

ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ В БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК *Shewanella oneidensis* MR-1 НА ПОВЕРХНОСТИ АНОДА И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВНЕШНЕЙ ЦЕПИ

© 2023 г. А. А. Самков^{1, *}, Ю. А. Чугунова^{1, 2}, М. Н. Круглова¹, Е. В. Моисеева¹, Н. Н. Волченко¹, А. А. Худокормов¹, С. М. Самкова¹, Э. В. Карасева¹

¹Кубанский государственный университет, Краснодар, 350040 Россия

²Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, 350063 Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.08.2022 г.

После доработки 27.09.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Обнаружено влияние полярности электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы, а также иммобилизации на аноде клеток *Shewanella oneidensis* MR-1, содержащих ген пероксидаз класса ДуР, на скорость обесцвечивания красителей разных типов. Для красителя трифенилметанового кристаллического фиолетового максимальная скорость обесцвечивания суспендированными клетками *S. oneidensis* MR-1 составила 2.05 ± 0.07 мкМ/ч и наблюдалась при подключении источника постоянного напряжения 1.2 В прямой полярности. Минимальные скорости наблюдались в случае обратной полярности подключения. При иммобилизации клеток на аноде удельная скорость обесцвечивания была выше, достигая 2.91 ± 0.09 мкМ/ч и не снижалась при повышении концентрации субстрата. Наименьшие показатели также были отмечены для обратного подключения источника напряжения. При обесцвечивании азокрасителя конго красного, максимальные значения скорости отмечены для источника с прямым подключением ионистора и при разомкнутой цепи (0.26 ± 0.01 и 0.29 ± 0.02 мкМ/ч соответственно), минимальное значение 0.11 ± 0.02 мкМ/ч наблюдали для обратного подключения. Для продуктов биоэлектрокаталитического обесцвечивания кристаллического фиолетового обнаружено значительное снижение интенсивности главного пика поглощения, соответствующего полосе 590 нм, практически без гипсохромного сдвига. О качественных изменениях состава продуктов обесцвечивания говорит появление нового максимума поглощения в районе 360 нм для варианта с прямой полярностью подключения ионистора. Результаты могут представлять интерес для разработки новых методов биоэлектрохимической очистки.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, *Shewanella oneidensis* MR-1, кристаллический фиолетовый, конго красный, биоэлектрокатализ, обесцвечивание, анод, микробный топливный элемент

DOI: 10.31857/S0555109923020125, **EDN:** LVGKHT

Воздействие различных биоэлектрохимических процессов на функционирование биологических систем привлекает в настоящее время все более пристальное внимание исследователей. Расширение поля задач в этой области связано со многими нерешенными вопросами, возникшими при анализе работы микробных топливных элементов, исходя от созданных в качестве альтернативного источника энергии. Данные устройства обнаруживали возможность использования для нужд экологической биотехнологии и разработки биосенсоров [1–4]. Получены многочисленные экспериментальные подтверждения изменения интенсивности биологической деградации раз-

личных веществ, в анаэробных условиях анодной зоны микробных топливных элементов [5, 6].

Известно, что происходящая в естественных условиях природных сред и микробиоценозов поляризация поверхности электрода, даже будучи ограничена величиной порядка от сотен мВ (на практике) до теоретических 1.105 В [7], способна влиять на биохимические процессы на границе раздела фаз электрод-жидкость.

Существует значительный пул исследований влияния биоэлектрохимических условий на процессы, происходящие в условиях сложных микробиоценозов непостоянного систематического состава, меняющихся в зависимости от ряда фак-

торов. При этом состав микробиоценоза может зависеть даже от освещенности анода. Так в работе Хиаохуан Ванг с соавт. [8] было обнаружено, что освещение обуславливает замещение псевдомонадами доминировавших в условиях отсутствия освещения представителей рода *Geobacter*. При исследованиях, открывших возможность влияния внешней электрической стимуляции на метаногенез, также было отмечено изменение состава микробиоценоза под действием внешнего напряжения 1.2 вольта. В работе [9] обнаружили, что биоэлектрохимическое воздействие стимулировало бродильщиков и гидрогенотрофных метаногенов, увеличивая продукцию метана в 8.6 раза. Таким образом, переход к более простой экспериментальной модели, включающей одну чистую культуру, позволяет исключить фактор смены состава сообщества.

К настоящему моменту известны работы, доказавшие возможность стимуляции слабыми внешними напряжениями, порядка десятых вольта, биодеструкционной активности, а также соответствующего роста экспрессии генов ключевых ферментов, на примере биодеградации *Pseudomonas sp.* DGYH-12 фенантрена [10], но вопросы кинетики процессов и оценки влияния на нее параметров внешней цепи, в том числе искусственной стимуляции, остаются в значительной мере открытыми.

Таким образом, простая модель на основе чистой культуры *S. oneidensis* MR-1, часто используемой в биоэлектрохимических системах [11, 12], позволит проверить влияние различных вариантов внешней электрической стимуляции реакций в анаэробной зоне. Целью стимуляции являются изменения качественных или количественных характеристик окислительно-восстановительных реакций, осуществляемых ассоциированными с анодом бактериями, обесцвечивающими редокс-устойчивые красители. Известно, что за обесцвечивание красителей отвечают, в том числе, бактериальные ферменты класса пероксидаз [13]. Обнаружено, что многие представители рода *Shewanella*, в том числе *S. oneidensis* MR-1 [14] имеют выраженную способность обесцвечивать различные красители, благодаря развитой системе ферментов, в том числе азоредуктаз и, прежде всего, пероксидаз класса DyP или краситель-обесцвечивающих пероксидаз (dye decolorizing peroxidases), действие которых может быть оценено по убыли субстрата в реальном времени [15–17]. Рассматривая чистую культуру шеванеллы как биологический агент биоэлектрохимической системы, в которой происходит обесцвечивание красителя, необходимо отметить сохранение ключевой роли экзоэлектронных микроорганизмов, опосредующих взаимодействие электрода и внешней среды также и в открытых системах [18]. Таким образом, полученные данные могут быть экстраполированы на более

сложные микробиоценозы, воздействие на которые через электроды биоэлектрохимических систем, конструктивно представляющих собой микробный топливный элемент (МТЭ) безмембранного типа, позволит влиять на биоремедиационные процессы уже в открытой системе.

Цель работы – экспериментально определить возможность влияния посредством внешней электрической стимуляции биоэлектрохимической системы слабыми напряжениями разной полярности на скорость обесцвечивания красителей культурой *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях анодной камеры МТЭ.

МЕТОДИКА

В работе использовали штамм бактерий *S. oneidensis* MR-1, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (№ в каталоге В-9861). Штамм выделен в 1987 г. из ила озера Онейдо, филогения описана Ивановой с соавт. [19] в 2004, относится к γ -протеобактериям. Штамм широко используется в научно-исследовательской деятельности в качестве экзоэлектронного микроорганизма, активно осуществляющего электрогенез и другие биохимические процессы [20].

В качестве биоэлектрохимической системы использовали МТЭ мембранного воздушнокатодного типа с объемом анодной камеры 69 мл [21]. Материалом электродов послужил углеродный войлок НТМ-200М (АО “НИИЭИ”, Россия) толщиной 4 мм, анод имел размер 20 × 50 мм, катод представлял собой диск из аналогичного материала диаметром 18 мм, капиллярно смачиваемый дистиллированной водой и прилегающий к катионообменной мембране МФ-4СК (ОАО “Пластполимер”, Россия). Обратная сторона диска контактировала с воздухом. Анод и катод контактировали со внешней цепью через графитовые стержни, вставленные в войлок. Перед использованием мембраны МФ-4СК переводили в протонную форму по стандартной методике окислительно-термического кондиционирования перфторированных мембран [22].

В роли среды анодной камеры использовали модельную сточную воду следующего минерального состава (мг/л): NaHCO_3 – 480; NH_4Cl – 95.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 146.7; KH_2PO_4 – 52.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 63.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 19.2 [23]. В качестве источника углерода и энергии применяли пептон (1 г/л).

Клетки *S. oneidensis* MR-1 выращивали на питательном агаре. Трехсуточную культуру смывали минеральной основой среды, дважды отмывали той же средой и вносили в анодные камеры.

Детали МТЭ, контактирующие с содержимым камер, стерилизовали автоклавированием. В ро-

ли биологического агента в камеры, заполненные стерильной средой, вносили *S. oneidensis* MR-1 либо в виде суспензии с конечной концентрацией в анодной камере 2×10^7 кл./мл, либо предварительно адсорбционно иммобилизованными на поверхности анода из НТМ-200М в среде минеральной основы используемой модельной сточной воды. Количество адсорбированных на аноде клеток учитывали по убыли их титра в среде для иммобилизации. Обеспечивали равенство биомассы клеток, вносимых в анодные камеры в суспендированном и адсорбированном виде.

Инкубирование МТЭ велось на орбитальных качалках Biosan Multi Shaker Psu 20i (“Biosan”, Латвия) при 60 об./мин при 25°C.

Для приложения внешней разности потенциалов использовали ионисторы Maxwell BCAP0350 E270 T11 (“Maxwell”, Китай) емкостью 350 Ф, отличающиеся низким током саморазряда 0.3 мА и предварительно заряженные до напряжения 1.2 В.

Измерение оптической плотности выполняли на спектрофотометре Leki SS2107 (“LEKI Instruments”, Финляндия) в спектрофотометрических кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм при длинах волн 590 нм (кристаллический фиолетовый) или 480 нм (конго красный). Регистрацию оптических спектров поглощения проводили с использованием программного обеспечения Leki ScanPro.

Использовали красители кристаллический фиолетовый и конго красный (АО “Вектон”, Россия), ЧДА.

Для осаждения клеток применяли центрифугу РС-6МЦ (“Dastan”, Киргизия).

Измерение разности потенциалов выполняли при помощи прецизионного цифрового мультиметра Актакон АММ-1139 (ЗАО НПП “Эликс”, Россия).

Выделение тотальной ДНК из чистых культур бактерий осуществляли набором diaGene 3318 (“Диаэм”, Россия). Для проведения амплификации применяли набор БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x) (“Биолабмикс”, Россия). ПЦР осуществляли в амплификаторе Authorized Thermal Cycler (“Eppendorf”, Германия). Использовали вырожденные праймеры для широкого круга бактериальных обесцвечивающих красителей пероксидаз, прямой 5'-GAYCTGTGCTTYGARCTSGC-3', обратный 5'-ASCCGATRAARTASGTGCC-3' [24] (“Синтол”, Россия). Продукты ПЦР визуализировали при проведении электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Применяли ДНК-маркер “Sky-High” (ООО “Биолабмикс”, Россия).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента, а также

U-критерия Манна–Уитни. Достоверным считали различие при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для штамма *S. oneidensis* MR-1 в ходе предварительных экспериментов была обнаружена способность к обесцвечиванию водных растворов кристаллического фиолетового и ряда других красителей в анаэробных условиях анодной камеры МТЭ. При помощи вырожденных праймеров, позволяющих выявлять широкий круг бактериальных генов пероксидаз класса DyP (обесцвечивающие красители пероксидазы), у используемой культуры *S. oneidensis* MR-1 было обнаружено присутствие возможного гомолога данного гена с характерным размером ампликона порядка 400 н.п. [24]. В случае примененного в качестве отрицательного контроля штамма *E. coli* M17 продукты отсутствовали, обнаруживаясь при использовании штамма *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, который использовали как положительный контроль. Штамм *R. erythropolis* ВКМ Ас-2017Д известен значительной деструктивной активностью в отношении широкого круга углеводородных субстратов и применением в экологической биотехнологии [25, 26].

МТЭ перед внесением обесцвечиваемого субстрата выдерживали в течение трех сут для выравнивания в анодных камерах разных ячеек условий, о чем судили по сходным значениям разностей потенциалов между анодом и катодом, формируемых электрогенной культурой *S. oneidensis* MR-1. После этого к аноду и катоду подключали один из трех вариантов внешних электрических цепей: пассивное сопротивление (резистор 1КОм), заряженный до напряжения 1.2 В ионистор с прямой полярностью подключения (отрицательный полюс подключен к аноду МТЭ), либо аналогичный ионистор с обратной полярностью подключения (положительный полюс к аноду). Ионисторы выступали в качестве источника тока и напряжения. При отсутствии резистора или ионистора цепь считалась разомкнутой.

Для предупреждения осаждения клеток *S. oneidensis* MR-1 на дно анодных камер и для оптимизации массопереноса МТЭ размещали на движущейся платформе орбитального шейкера при температуре 25°C и 100 об./мин. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

В анодные камеры вносили концентрированный раствор одного из красителей – кристаллического фиолетового или конго красного до конечной концентрации 2.5 мг/л, фиксируя динамику оптической плотности при длине волны, соответствующей максимуму поглощения водного раствора данного красителя. По истечении 1 сут инкубации краситель вносили повторно,

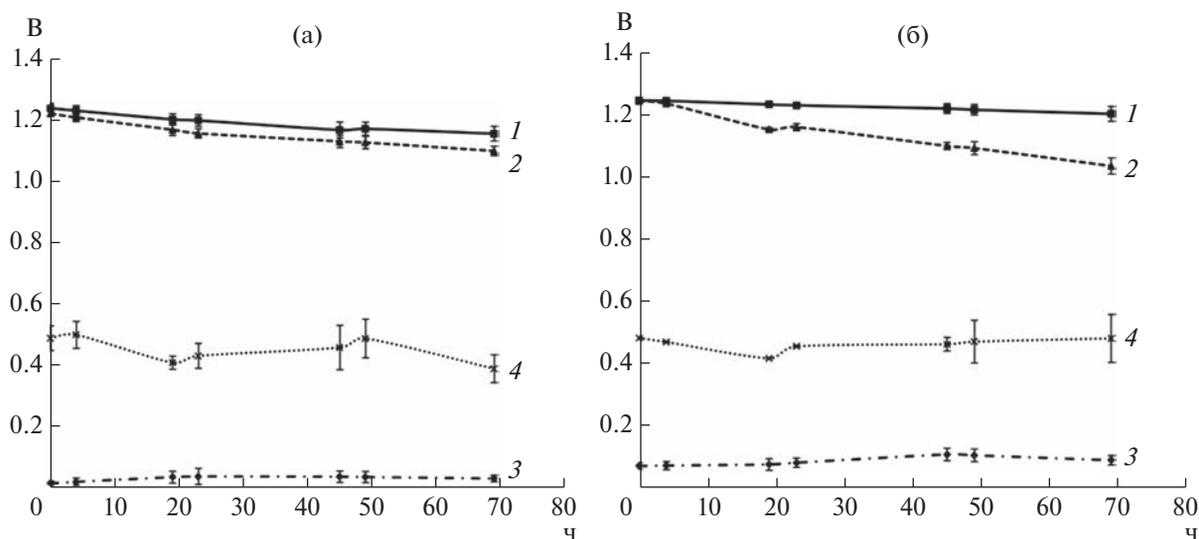


Рис. 1. Динамика разности потенциалов между электродами биоэлектрохимических систем в ходе обесцвечивания кристаллического фиолетового суспендированными (а) и иммобилизованными (б) клетками *S. oneidensis* MR-1 в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи: 1 – ионистор прямой полярности подключения; 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь.

ступенчато увеличивая концентрацию на 7.5 мг/л в сут (расчетные концентрации 2.5, 10.0 и 17.5 мг/л), периодически фиксируя оптическую плотность. Такая схема эксперимента была сформирована для возможности оценки зависимости удельной скорости обесцвечивания красителя, а также и от концентрации данного субстрата.

После 3 сут инкубации в холостом режиме, начиная с момента первого внесения красителей, дополнительно фиксировали разности потенциалов между катодом и анодом. Для варианта “ионистор “–”” (ионистор с обратной полярностью подключения, то есть положительный полюс подключен к аноду, а отрицательный к катоду) приведены модули значений, для расположения графиков напряжения в положительной координатной полуплоскости. Полученные результаты показаны на рис. 1.

При естественной поляризации иммобилизованные клетки давали небольшой прирост разности потенциалов по сравнению со свободными. Разница была значительной при наличии во внешней цепи резистора, замыкавшего цепь и снижавшего данный показатель. Колебания напряжения, заметные в случае разомкнутой цепи, совпадали со временем внесения красителя и могли быть связаны как со стрессовым воздействием субстрата на культуру, так и с повышением окислительно-восстановительного потенциала камеры из-за попадания в нее кислорода. Значительный интерес представлял график разряда ионисторов: при подключении отрицательным полюсом к катоду (“ионистор “–””) разряд происходил значительно быстрее по сравнению с прямой полярностью (“ионистор “+””), что было более выражено

при условии иммобилизации клеток. Таким образом, наличие биологического агента, локализованного на границе раздела фаз электрод/жидкость, заметно увеличивало эффективность переноса электрического заряда при обратной полярности подключения.

Для исследования кинетических параметров обесцвечивания кристаллического фиолетового, после отбора проб через герметичные отводы и осаждения клеток в центрифуге, проводили оценку оптической плотности при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения красителей. Динамика оптической плотности, в соответствии с тремя внесениями красителя, имела ступенчатый характер (рис. 2). По скорости снижения показателя в течение 3 ч после каждого очередного добавления субстрата оценивали удельную скорость реакции. При использовании суспендированных клеток *S. oneidensis* MR-1 в эксперименте с кристаллическим фиолетовым имело место значительное влияние как наличия биологического агента, так и устройства внешней цепи, в разной степени влияющих на динамику обесцвечивания субстрата. Некоторое снижение D_{590} в стерильном контроле, после первого внесения красителя до концентрации 2.5 мг/л, могло быть связано с адсорбцией красителя на развитой поверхности войлока НТМ-200М. После второго и последующего внесения дальнейшего уменьшения D_{590} в условиях стерильной среды практически не происходило. Необходимо отметить более выраженную интенсивность обесцвечивания при использовании суспендированных клеток и применении во внешней цепи ионистора, поднимающего разность по-

тенциалов между анодом и катодом до 1.2 В, с соблюдением естественной полярности, формирующейся в МТЭ.

На рис. 2б показана динамика снижения D_{590} раствора кристаллического фиолетового при ступенчатом внесении в анодную камеру МТЭ в зависимости от внешней цепи в том случае, когда на аноде были предварительно адсорбционно иммобилизованы клетки *S. oneidensis* MR-1.

Локализация клеток *S. oneidensis* MR-1 на границе раздела анод/среда значительно влияла на динамику обесцвечивания вносимого поэтапно красителя, что иллюстрировалось более интенсивным снижением показателя при использовании иммобилизованных клеток в течение первых 4 ч после каждого очередного добавления кристаллического фиолетового, относительно последующих 20 ч инкубации, до следующего цикла повышения концентрации.

Для оценки зависимости кинетических параметров обесцвечивания кристаллического фиолетового от режима внешней электрической цепи были построены графики зависимости удельной скорости реакции от концентрации красителя для всех вариантов цепей (резистор, подключенные прямой и обратной полярностью ионисторы, разомкнутая цепь) и локализации клеток (супендированные либо иммобилизованные на аноде). Поскольку наибольшая интенсивность обесцвечивания имела место в первые 4 ч после внесения субстрата, этот диапазон представлял наибольший интерес как с теоретической, так и с практической (проточные системы очистки) точки зрения. Результаты приведены на рис. 3.

Локализация клеток в наиболее электрохимически активной зоне на поверхности анода, значительно влияла на зависимость кинетики обесцвечивания трифенилметанового красителя от концентрации субстрата. В случае супензии клеток при достижении концентрации субстрата около 20 мкМ, наблюдалось устойчивое снижение удельной скорости реакции для всех вариантов внешних цепей. При этом приложение внешнего источника тока и разности потенциалов в соответствии с полярностью микробных топливных элементов, где отрицательно заряженный электрод — анод в МТЭ выполнял функцию приема электронов, обеспечило почти двукратное повышение максимальной скорости по сравнению с остальными вариантами. Максимальная скорость в этом случае достигала 2.05 ± 0.07 мкМ/ч, при разомкнутой цепи — 1.30 ± 0.08 , использовании ионистора с обратной полярностью — 0.83 ± 0.04 , резистора — 1.10 ± 0.07 мкМ/ч. В случае адсорбированных клеток в этом же диапазоне концентраций субстрата снижение удельной скорости обесцвечивания не происходило, показатели достигали для трех вариантов (разомкнутая цепь, ионистор с прямой по-

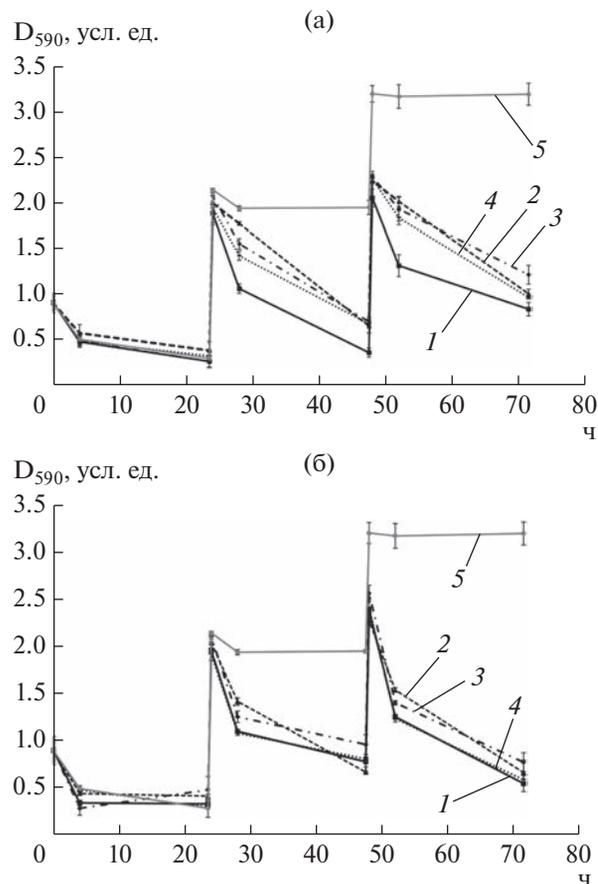


Рис. 2. Динамика изменения D_{590} раствора кристаллического фиолетового при ступенчатом внесении в анодную камеру МТЭ в присутствии супендированных (а) и иммобилизованных на аноде (б) клеток *S. oneidensis* MR-1, в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы: 1 — ионистор прямой полярности подключения, 2 — ионистор обратной полярности подключения, 3 — резистор 1 КОм, 4 — разомкнутая цепь, 5 — контроль.

лярностью подключения, резистор) близких значений — 2.78 ± 0.05 — 2.91 ± 0.09 мкМ/ч. В случае ионистора с обратной полярностью обнаружено низкое значение скорости — 2.09 ± 0.05 мкМ/ч.

Для проверки гипотезы влияния принудительной поляризации на биоэлектрохимические процессы обесцвечивания красителей был поставлен аналогичный эксперимент с азокрасителем конго красным, существенно отличающимся по строению молекулы. Для супензионных клеток *S. oneidensis* MR-1 была построена зависимость удельной скорости обесцвечивания данного красителя от концентрации субстрата при условиях внешней цепи, аналогично предыдущему эксперименту с кристаллическим фиолетовым (рис. 4).

При сходных показателях резистора, положительно подключенного ионистора и разомкнутой

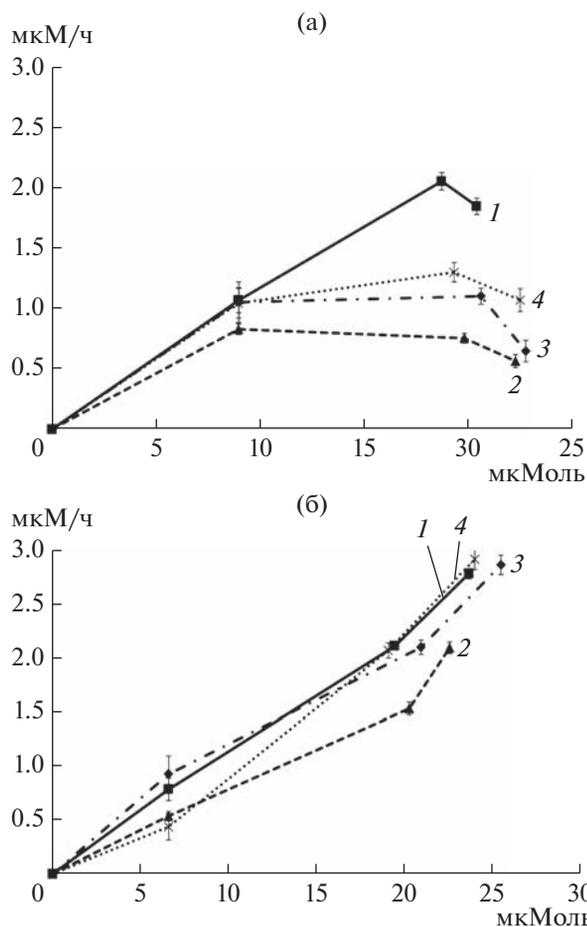


Рис. 3. Удельная скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового суспендированными (а) и иммобилизованными на аноде (б) клетками *S. oneidensis* MR-1 в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы и концентрации красителя: 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь.

цепи, вариант опыта с подключенным отрицательной полярностью ионистором отличался минимальными показателями удельной скорости, что соответствовало результатам предыдущего эксперимента с кристаллическим фиолетовым. Сходство показателей удельной скорости обесцвечивания с применением резистора, положительно подключенного ионистора и разомкнутой цепи, целесообразно связать с общей низкой скоростью обесцвечивания данного красителя используемой культурой. Максимальный показатель не превышал 0.3 мкМ/ч, что практически на порядок меньше скоростей обесцвечивания кристаллического фиолетового.

Известно, что N-деметилирование и расщепление сопряженной хромофорной структуры являются наиболее распространенными путями

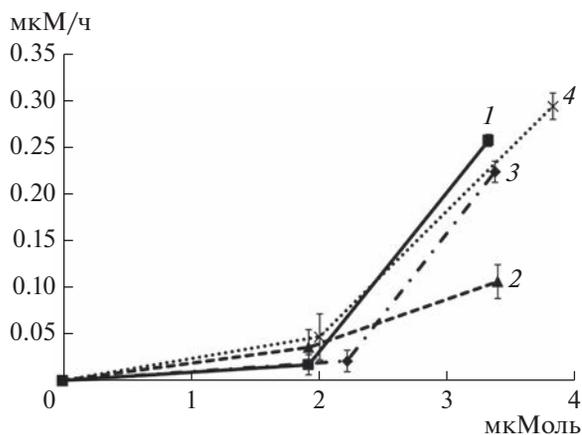


Рис. 4. Зависимость удельной скорости обесцвечивания (мкМ/ч) конго красного клетками *S. oneidensis* MR-1 от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы и концентрации красителя: 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь.

биологической деградации трифенилметановых красителей [27–29]. Для общей оценки возможного изменения состава продуктов распада кристаллического фиолетового, после проведения эксперимента с обесцвечиванием, дополнительно были проанализированы оптические спектры поглощения, в области максимума поглощения исследуемого вещества в диапазоне длин волн от 330 до 830 нм. В качестве образца сравнения использовали дистиллированную воду, среда без добавления красителя в данной области не имела выраженных полос поглощения. Спектральные кривые для всех экспериментальных вариантов с суспензионными клетками *S. oneidensis* MR-1, а также для контроля, приведены на рис. 5.

Для всех экспериментальных вариантов характерно значительное снижение интенсивности главного пика поглощения красителя, соответствующего полосе 590 нм. При этом обращает на себя внимание отсутствие или относительно малые (в пределах 5–10 нм) гипсохромные сдвиги основной полосы с максимумом поглощения 590 нм и коротковолнового плеча, даже при высоких степенях разложения. Для резистора 1 КОм основная полоса находилась на 585 нм, “ионистор “+”” – 580 нм, “ионистор “–”” – 590 нм, разомкнутая цепь – 585 нм. В то же время в работе [30], в которой были изучены спектры кристаллического фиолетового после воздействия пероксидазы класса DyP (обесцвечивающей краситель пероксидазы) из *Bacillus amyloliquefaciens*, был показан сдвиг основного пика и коротковолнового плеча в коротковолновую область, составляющий десятки нанометров, до значения 547.5 нм. Это было интерпре-

тировано как признак разрушения сопряженной хромофорной структуры и удаления электронодонорной группы, на что также указано в работах других авторов [31, 32]. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о более полном процессе деградации красителя до не поглощающих в данном спектральном диапазоне соединений.

Отмечено сохранение полос поглощения в коротковолновой области, что может быть связано с накоплением продуктов распада кристаллического фиолетового, основная полоса поглощения которого находится при 590 нм, а также иных микробных метаболитов. При этом, для большинства экспериментальных вариантов основной максимум поглощения приходился на 340–345 нм (в контроле – 340 нм), в то время как вариант “ионистор +” показал появление нового максимума поглощения в коротковолновой области, в районе 360 нм при сохранении заметного плеча на 340 нм. Известно, что продуктами распада кристаллического фиолетового могут быть N,N-диметил-N',N'-диметил-N"-метилпарарозанилин, N,N-диметил-N',N'-диметилпарарозанилин, N,N-диметилпарарозанилин, N-метилпарарозанилин, 4,4'-бис(диметиламино)бензофенон (кетон Михлера), 4-(N-метиламино)-4'-(N'-метиламино)бензофенон, 4-(N-метиламино)-4'-аминобензофенон, N, N-диметиланилин, бензохинон) [30], причем для *Shewanella* наиболее характерными являются N,N-диметиламинобензальдегид и кетон Михлера [33].

Таким образом, различия в расположении полос поглощения продуктов обесцвечивания кристаллического фиолетового чистой культурой *S. oneidensis* MR-1 указывают не только на количественные, но и качественные изменения процесса в разных биоэлектрохимических условиях, наиболее выраженных при стимулировании внешним источником слабого электрического поля и напряжения, подключенного в соответствии с естественной полярностью микробного топливного элемента, выступающего в качестве реактора. Эффект стимулирования или ингибирования обесцвечивания проявлялся в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала анодной камеры биоэлектрохимической системы. За счет естественной поляризации поверхности электродов (разомкнутая цепь и резистор 1 КОм) или, что более выражено, при положительной стимуляции ионистором прямого подключения, могло происходить ускорение процесса N-деметилирования, расщепление одного из ароматических колец и иных ключевых реакций обесцвечивания. Данные реакции могут быть связаны с потоком восстановительных эквивалентов, передаваемых шеванеллой вовне цитохромами наружной мембраны, а также через переносчик рибофлавин в условиях наличия искусственного акцептора электронов – отрицательно заряженного анода. Напротив, при подключении

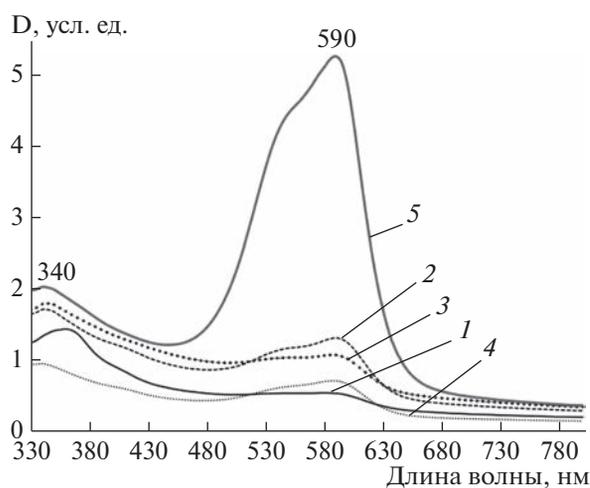


Рис. 5. Спектры поглощения продуктов разложения кристаллического фиолетового культурой *S. oneidensis* MR-1 в зависимости от условий электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы: 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 КОм, 4 – разомкнутая цепь, 5 – контроль.

ионистора с обратной полярностью данный эффект мог нивелироваться, так как анод имел противоположный знак заряда. Сопряжение реакций биodeградации красителей, электрогенеза (*S. oneidensis* MR-1) и возможных электрохимических процессов на аноде зависит, таким образом, от знака заряда внешнего источника тока и напряжения, подключенного к электродам биоэлектрохимической системы. Химизм реакции восстановления азосвязи, приводящей к обесцвечиванию азокрасителей в анаэробных условиях, упоминаемый в работе российских авторов [34], позволяет предположить связь экзоэлектрогенной активности *S. oneidensis* MR-1 с передачей энергии, поступающей в биоэлектрохимическую систему через внешнюю цепь от источника тока, что катализировало или ингибировало реакции восстановления азосвязей и обесцвечивание конго красного, в зависимости от полярности подключения. В исследовании Чао Ли с соавт. [35] восстановление и разрыв двойной связи между атомами азота, приводящие к обесцвечиванию конго красного, также связывали с электроактивными бактериальными биопленками на аноде микробного топливного элемента. Авторы констатировали ускорение обесцвечивания при замкнутой цепи по сравнению с разомкнутой. Это согласуется с положительным влиянием на обесцвечивание красителей интенсификации переноса заряда и иных электрохимических процессов на поверхности анода, в результате стимуляции внешним источником тока и напряжения, усиливающим естественную разность потенциалов между электродами.

Таким образом, при обесцвечивании трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового и азокрасителя конго красного культурой *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях анодной камеры биоэлектрохимической системы было обнаружено влияние полярности подключения к электродам внешнего источника тока и напряжения. Увеличение удельной скорости реакции при ступенчатом повышении концентрации субстрата было отмечено для вариантов опыта, где происходила поляризация электродов, как естественная, до 0.59 В, за счет электрогенеза *S. oneidensis* MR-1, так и более выраженная искусственная – в условиях положительной стимуляции источником постоянного тока и напряжения 1.2 В прямого подключения (отрицательный полюс к аноду, положительный – к воздушному катоду). При обратном подключении источника напряжения положительным полюсом к аноду во всех случаях наблюдалось снижение удельной скорости обесцвечивания как для кристаллического фиолетового так и для конго красного, что сопровождалось повышенным расходом электрического заряда используемого в качестве источника тока и напряжения ионистора. Имобилизация клеток на поверхности анода значительно усиливала скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового по сравнению с суспендированными клетками, при этом, негативный эффект обратного подключения ионистора сохранялся. Таким образом, искусственная внешняя поляризация электродов биоэлектрохимической системы позволяла как положительно, так и отрицательно влиять на осуществляемые электрогенной культурой реакции, приводящие к обесцвечиванию красителей разных типов в анаэробной среде анодной камеры. Экзоэлектрогенная активность клеток *S. oneidensis* MR-1, способных к передаче заряда вовне, при помощи систем цитохромов и специальных клеточных структур, может обеспечивать сопряжение внешней электрической цепи и энергоемких биохимических процессов, происходящих в прилегающем объеме, в том числе восстановления и разрыва двойной связи между атомами азота в молекуле конго красного, N-деметилирования и расщепления сопряженной хромофорной структуры кристаллического фиолетового.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-24-00401, <https://rscf.ru/project/22-24-00401/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дебабов В.Г. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 149–157.
2. Решетилов А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 268–274.
3. Li W.-W., Yu H.-Q. // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. P. 1–12.
4. Алферов С.В., Арлянов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 637–643.
5. Самков А.А., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Калашников А.А., Веселовская М.В. // Политематический сетевой электронный научный журн. Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 101. С. 496–510.
6. Idris M.O., Kim H.-C., Yaqoob A.A., Ibrahim M.N.M. // Sust. Energy Technol. Assess. 2022. V. 52. B. 102183.
7. Obileke Ke C., Onyeaka H., Meyer E.L., Nwoko N. // Electrochem. Commun. 2021. V. 125. P. 1–14.
8. Wang X., Hu J., Chen Q., Zhang P., Wu L., Li J. et al. // Water Res. 2019. V. 156. P. 125–135.
9. Zhi Z., Pan Y., Lu X., Wang J., Zhen G. // Sci. Total Environ. 2022. V. 814. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152736>
10. Wang X., Wan G., Shi L., Gao X., Zhang X., Li X., Zhao J., Sha B., Huang Z. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 31449–31462. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05670-5>
11. Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Мордкович Н.Н., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 339–344.
12. Воейкова Т.А., Емельянова Л.К., Новикова Л.М., Шакулов Р.С., Сидорук К.В., Смирнов И.А. и др. // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 402–407.
13. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Ажогина Т.Н., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 327–335.
14. Yang C., Zhang J., Zhang B., Liu D., Jia J., Li F., Song H. // Synth. Syst. Biotechnol. 2022. V. 7. P. 918–927.
15. Hong Y., Guo J., Xu Z., Mo C., Xu M., Sun G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 647–654.
16. Xiao X., Xu C.-C., Wu Y.-M., Cai P.-J., Li W.-W., Du D.-L., Yu H.-Q. // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 86–90.
17. Lizárraga W.C., Mormontoy C.G., Calla H., Castaneda M., Taira M., Garcia R., Marín C., Abanto M., Ramirez P. // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. P. 1–7.
18. Shi J., Zhao S., Yu X., Zhou T., Khan A., Yu Z., Feng P., Wang J., Liu P., Li X. // Int. J. Hydrog. Energy. 2019. V. 44. P. 10091–10101.
19. Ivanova E.P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1773–1788.
20. Bose S., Hochell M.F. Jr., Gorby Y.A., Kennedy D.W., McCready D.E., Madden A.S., Lower B.H. // Geochim. Cosmochim. Acta. 2009. V. 73. P. 962–976.
21. Фалина И.В., Самков А.А., Волченко Н.Н. // Наука Кубани. 2017. № 2. С. 4–11.
22. Berezina N.P., Timofeev S.V., Kononenko // J. Membr. Sci. 2002. V. 209. P. 509–518.
23. Jadhav G.S., Ghangrekar M.M. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 717–723.
24. Tian J.-H., Pourcher A.-M., Klingelschmitt F., Le Roux S., Peu P. // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 130. P. 148–153.
25. Самков А.А., Джимаков С.С., Барышев М.Г., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самкова С.М., Карасева Э.В. // Биофизика. 2015. Т. 60. № 1. С. 136–142.

26. Самков А.А., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самкова С.М., Карасева Э.В. // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 1. С. 194–202.
27. Chhabra M., Mishra S., Sreekrishnan T.R. // J. Biotechnol. 2009. V. 143. P. 69–78.
28. Singh R., Eltis L.D. // Arch. Biochem. Biophys. 2015. V. 574. P. 56–65.
29. Lončar N., Colpa D.I., Fraaije M.W. // Tetrahedron. 2016. V. 72. P. 7276–7281.
30. Zhang Y., Ren J., Wang Q., Wang S., Li S., Li H. // Biochem. Eng. J. 2021. V. 168. P. 1–8.
31. Kalyani D.C., Patil P.S., Jadhav J.P., Govindwar S.P. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. P. 4635–4641.
32. Sathishkumar P., Balan K. Palvannan T., Kamala–Kannan S., Oh B.-T., Rodríguez–Couto S. // Clean (Weinh). 2013. V. 41. P. 665–672.
33. Chen C.-H., Chang C.-F., Ho C.-H., Tsai T.-L., Liu S.-M. // Chemosphere. 2008. V. 72. P. 1712–1720.
34. Емашова Н.А., Комова И.Б., Непрусов А.И., Каляжный С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 195–201.
35. Li C., Luo M., Zhou S., He H., Cao J., Luo J., Fang F. // Int. J. Hydrog. Energy. 2020. V. 45. P. 29417–29429.

Decolorization of Dyes in the Bioelectrochemical System Depending on the Immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1 Cells on the Anode Surface and Electrical Stimulation of the External Circuit

A. A. Samkov^{a, *}, Yu. A. Chugunova^{a, b}, M. N. Kruglova^a, E. V. Moiseeva^a, N. N. Volchenko^a, A. A. Khudokormov^a, S. M. Samkova^a, and E. V. Karaseva^a

^aKuban state university, Krasnodar, 350040 Russia

^bKuban State Medical University, Krasnodar, 350063 Russia

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

The effect of the polarity of the electrical stimulation of the external circuit of the bioelectrochemical systems, as well as the immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells containing the DyP peroxidase gene on the rate of discoloration of dyes of different types was found. For the crystal violet triphenylmethane dye, the maximum decolorization rate by suspended *S. oneidensis* MR-1 cells $2.05 \pm 0.07 \mu\text{M/h}$ was noted in the case of connecting a 1.2 V direct polarity DC voltage source. One of the minimum rates was observed in the case of reverse polarity of the connection. In the case of cells immobilized on the anode, the rate was higher, reaching $2.91 \pm 0.09 \mu\text{M/h}$ and did not decrease with increasing substrate concentration. The lowest values were also noted for the reverse connection of the voltage source. In case of the azo dye congo red, the maximum rate was found for a source with direct connection and an open circuit (0.26 ± 0.01 and $0.29 \pm 0.02 \mu\text{M/h}$, respectively), the minimum value is $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M/h}$ for reverse connection. For the crystal violet decolorization products, a significant decrease in the intensity of the main absorption peak at 590 nm band was found, with no notable hypsochromic shift. The qualitative changes in the decolorization products composition are indicated by the appearance, in case of a direct polarity of the ionistor connection, of a new absorption maximum in the region of 360 nm. The results may be of interest for the development of new methods of bioelectrochemical cleaning.

Keywords: bioelectrochemical system, *Shewanella oneidensis* MR-1, crystal violet, congo red, bioelectrocatalysis, decolorization, anode, microbial fuel cell

УДК 581.1:633.358:577.13

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МУТУАЛИСТА И ФИТОПАТОГЕНА НА ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ α АМФ И H_2O_2 В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА СОРТА РОНДО И ЕГО БЕСКЛУБЕНЬКОВОГО И СУПЕРКЛУБЕНЬКОВОГО МУТАНТОВ

© 2023 г. Л. А. Ломоватская¹ *, О. В. Захарова¹, А. М. Гончарова¹, А. С. Романенко¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Иркутского научного центра СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

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

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.

После доработки 07.09.2022 г.

Принята к публикации 12.09.2022 г.

Исследованы изменения концентраций пероксида водорода и циклического аденозинмонофосфата (α АМФ) в корнях проростков гороха сорта Рондо и его суперклубенькового мутанта Nod3 и бесклубенькового K14 при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм RCAM 1022) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845). Показано, что через 360 мин после инфицирования проростков гороха сорта Рондо уровень эндогенного пероксида водорода незначительно отличался от контроля. В корнях проростков Nod3 этот уровень существенно снижался, а в корнях K14 достоверно возрастал при инфицировании штаммом 1845, но оставался без изменений при воздействии бактерий штамма RCAM 1022. В тоже время инфицирование RCAM 1022 в течение 360 мин приводило к резкому возрастанию уровня α АМФ в зонах зачатков и молодых волосков корня проростков Рондо, тогда как штамм 1845 не оказывал влияния на этот показатель. На концентрацию α АМФ в корнях проростков мутанта Nod3 оба вида бактерий не оказывали воздействия, тогда как у K14 под воздействием RCAM 1022 уровень α АМФ возрастал почти в 2 раза, а под воздействием 1845 – снижался. Предполагается, что пероксид водорода и α АМФ могут принимать участие в формировании суперклубенькового и бесклубенькового фенотипов мутантов, а также в формировании устойчивости к специфическому патогену, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Возможно, что данный феномен можно использовать для диагностики устойчивости вновь создаваемых мутантов и сортов гороха к возбудителю бактериального ожога.

Ключевые слова: суперклубеньковый мутант гороха Nod3, бесклубеньковый мутант гороха K14, горох сорта Рондо, H_2O_2 , α АМФ, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

DOI: 10.31857/S0555109923020113, **EDN:** LLWBKA

Фиксация атмосферного азота растениями семейства *Fabaceae* осуществляется в тесном контакте с бактериальными микрочастичками родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Bradyrhizobium*. Известно, что процесс азотфиксации находится под генетическим контролем растения-хозяина, определяя число формирующихся клубеньков, их размеры и морфологию [1]. В связи с этим существенное значение имеет изменение концентраций сигнальных молекул в клетках растения-хозяина на ранних этапах ризобийной инфекции, поскольку вторичные мессенджеры через сигнальные каскады участвуют в регуляции экспрессии специфических генов. С этим связано кратковременное повышение концентраций активных форм кислорода и азота [2, 3], а также Ca^{2+} [4]. С этой точки зрения хорошим объектом для исследова-

ний являются мутанты гороха, различающиеся по образованию клубеньков. Однако мутации могут вызвать изменение чувствительности к бактериальным патогенам. Поскольку в реализации механизмов устойчивости/восприимчивости принимают участие сигнальные системы растения, в частности вторичный мессенджер аденилатциклической сигнальной системы, циклический аденозинмонофосфат (α АМФ) [5, 6], их функционирование в мутантных растениях гороха является весьма важным показателем.

Цель данной работы – исследование изменений концентраций H_2O_2 и α АМФ в зонах роста корня проростков гороха (*Pisum sativum*) сорта Рондо и мутантов, полученных из этого сорта, суперклубенькового (Nod3) и бесклубенькового (K14), при инфицировании *Rhizobium leguminosarum* bv.

viciae (штамм RCAM 1022) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845).

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили 3-суточные проростки гороха (*Pisum sativum*) сорта Рондо и суперклубенькового (Nod3) и бесклубенькового (K14) мутантов этого сорта, а также планктонные культуры *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, эффективный по азотфиксации штамм RCAM 1022, полученный из Вedomственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Всероссийского научно-исследовательского института сельского хозяйства (ВНИИСХМ); *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (штамм 1845), полученный из Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии.

Культивирование бактерий. Бактериальные культуры выращивали в колбах на жидкой среде, содержащей просветленный гороховый отвар, 15 г/л глюкозы, рН 7.0. Титр планктонной культуры бактерий определяли на планшетном спектрофотометре “АИФР-01 Униплан” (“ЗАО Пикон”, Россия) при длине волны 655 нм.

Проращивание семян гороха. Семена гороха последовательно стерилизовали и промывали 5 мин в 94%-ном этаноле, 5 мин в 5%-ном растворе перманганата калия и 5 мин в 3%-ном перексиде водорода. На конечном этапе отмывали стерильной водой и замачивали при 60°C на 4 ч. Семена проращивали в стерильных чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге в течение 3 сут в темноте при 23–25°C. Проростки промывали стерильным 0.01%-ным раствором нонидета (неионный детергент) для удаления экзогенной микрофлоры. Отмывали трижды стерильной дистиллированной водой и инокулировали одним из видов бактерий, находящихся на стационарной фазе роста.

Титр планктонной культуры бактерий составлял 0.1×10^8 . Инокуляцию проводили в течение 5 или 360 мин, после чего корни проростков отделяли от горошины, промывали в стерильном 0.01%-ном растворе нонидета для удаления слабосвязанных бактерий, а затем промывали трижды в стерильной воде.

Особенностью бобовых является то, что не весь корень проростков обладает восприимчивостью к ризобиям, а только его отдельные участки, отличающиеся по степени сформированности корневых волосков, то есть присутствию на них зачатков, молодых или зрелых корневых волосков. В настоящей работе на основании литературных данных [7] и собственных исследований с помощью световой микроскопии первичный корень длиной 35–40 мм делили на пять участков, отличающихся по степени сформированности волосков: I –

апикальная меристема (2 мм от кончика); II – зона без корневых волосков (2–7 мм); III – зона, содержащая зачатки корневых волосков (7–12 мм); IV – зона молодых корневых волосков (12–17 мм); V – зона сформированных корневых волосков (17–22 мм от кончика корня), и отдельно эпикотиль – VI зона [8].

Определение интенсивности адгезии бактерий. После инкубации с бактериями корни проростков нарезали на отрезки в соответствии с указанными зонами и каждый образец растирали в стерильной воде, после чего делали рассеянный посев на чашки Петри с агаризованной питательной средой, аналогичной по составу жидкой среде для культивирования каждого вида бактерий. Через 3 сут подсчитывали колониеобразующие единицы (КОЕ), отражающие количество бактерий, адгезирующихся в каждой зоне корня. В экспериментах использовали по 10 проростков.

Определение концентраций H_2O_2 и цАМФ. Уровень эндогенного H_2O_2 определял FOX-методом, основанным на изменении окраски ксиленолового оранжевого [9]. Концентрацию цАМФ в отрезках корня гороха определяли методом ИФА [8]. Концентрации эндогенных H_2O_2 и цАМФ выражали в мкмоль/мг белка или нмоль/мг соответственно. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда, для построения калибровочного графика использовали БСА. Все эксперименты проводили в 3-кратных биологических повторностях, определение уровня цАМФ и H_2O_2 – в 8-кратных аналитических повторностях. На графиках результаты представлены в процентах к контролю, которым служили неинфицированные растения.

Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На графиках представлены средние значения и ошибки среднего (SE). Достоверность различий между группами значений вычисляли по критерию Дункана при $P \leq 0.05$. Достоверность различий определялась между значениями для сорта Рондо и каждого из мутантов. Достоверно различающиеся значения на графиках отмечены звездочками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие растений с любыми типами микроорганизмов начинается с адгезии [10]. Эксперименты показали, что как через 5 мин, так и через 360 мин наиболее интенсивная адгезия бактерий происходила в зонах зрелых и старых корневых волосков, и была более высокой у ризобий RCAM 1022 (рис. 1). При этом самый высокий уровень адгезии бактерий этого вида сохранялся на корнях проростков мутантов Nod3 и K14, но не на корнях проростков исходного сорта Рондо. Интенсивность адгезии штамма 1845 также существенно различалась у проростков сорта и мутан-

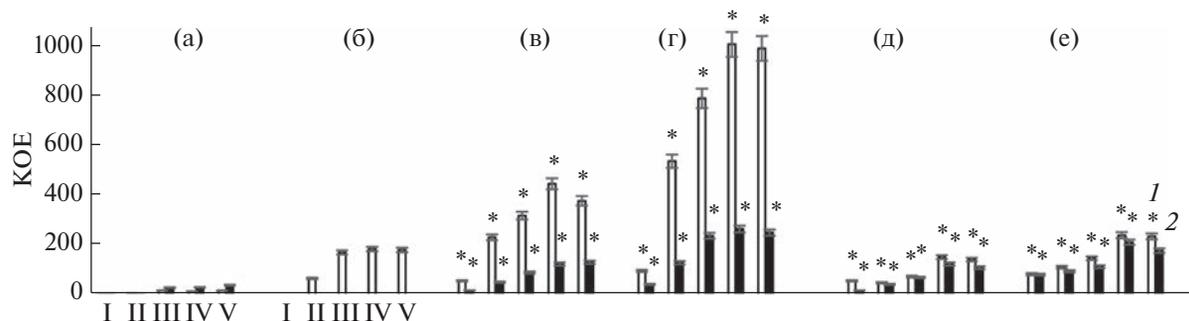


Рис. 1. Интенсивность адгезии *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* (1) и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (2) на корнях проростков гороха (зоны I–V) сорта Рондо (а, б) и его мутантов – Nod3(в, г) и K14 (д, е) через 5 (а, в, д) и 360 (б, г, е)мин после инокуляции. *Различия статистически значимы при сравнении сорта Рондо (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$.

тов. Через 5 мин коинкубации адгезия этого вида бактерий на корнях проростков гороха сорта Рондо была незначительной, тогда как у проростков Nod3 превышала ее в 6–8 раз, а на корнях K14 была – в 2–3 раза. Через 360 мин адгезия на всех участках корня проростков Рондо уже отсутствовала полностью, тогда как на корнях Nod3 еще усилилась, а у K14 осталась примерно на уровне, зафиксированном через 5 мин коинкубации (рис. 1).

Тесный контакт с бактериями вызывает в растениях активацию сигнальных систем [11].

Следует отметить, что исходные концентрации эндогенного пероксида водорода и цАМФ в корнях и эпикотиле проростков гороха значительно различались у сорта Рондо и его мутантов, Nod3 и K14 (табл. 1, 2). Причем, если концентрация эндогенного пероксида водорода в органах проростков Nod3 превышала уровень в проростках Рондо в 3–5 раз, то в проростках K14 всего в 2.0–2.5 раза (табл. 1). В тоже время уровень эндогенного цАМФ как в проростках Nod3, так и K14 превышал аналогичный параметр в проростках Рондо в 20–25 раз (табл. 2).

Коинкубация проростков с обоими видами бактерий приводила к изменению концентраций эндогенных пероксида водорода и цАМФ. У про-

ростков Рондо через 5 мин взаимодействия с ризобиями в наибольшей степени уровень пероксида водорода возрастал в зонах II и III, снижаясь при этом немного ниже контроля в эпикотиле (рис. 2). Под воздействием штамма 1845 концентрация этой сигнальной молекулы увеличивалась по сравнению с контролем почти в одинаковой степени во всех зонах корня, но в меньшей степени, чем при воздействии штамма RCAM 1022.

Через 360 мин коинкубации с RCAM 1022 уровень пероксида водорода опускался ниже контроля в зонах зачатков и молодых корневых волосков (зоны II и III), оставаясь почти на уровне 100% в остальных участках корня и эпикотиле. Под воздействием штамма 1845 концентрация H_2O_2 сохранялась на уровне 120% во всех участках корня и эпикотиле. У проростков гороха Nod3 через 5 и 360 мин коинкубации с обоими видами бактерий происходило достоверное снижение уровня H_2O_2 от 50 до 70% от контроля во всех зонах, тогда как в эпикотиле этот показатель был близок к 100% (рис. 2). В корнях проростков K14 через 5 мин инфицирования теми же видами бактерий уровень H_2O_2 достоверно снижался, но в меньшей степени, оставаясь на уровне 100% в некоторых зонах (IV и V) и эпикотиле (рис. 2). Через 360 мин под

Таблица 1. Концентрация эндогенного H_2O_2 в зонах роста проростков гороха и эпикотиле, мкмоль/мг белка

Сорт или мутант	Зоны роста корня					Эпикотиль
	меристема, I	зачатков корневых волосков, II	молодых корневых волосков, III	зрелых корневых волосков, IV	старых корневых волосков, V	
Рондо	13.4 ± 1.1	11.4 ± 10.1	12.7 ± 11.8	14.4 ± 12.9	15.7 ± 13.9	26.3 ± 2.5
Nod3	77.3* ± 7.0	81.7* ± 7.9	80.9* ± 7.9	76.3* ± 7.3	78.9* ± 7.6	90.2* ± 8.7
K14	27.1* ± 2.6	28.3* ± 2.5	29.5* ± 2.6	27.0* ± 2.6	28* ± 2.7	38* ± 3.5

* Различия статистически значимы при сравнении сорта “Рондо” (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$.

Таблица 2. Концентрация эндогенного цАМФ в зонах роста проростков гороха и эпикотиле, наномоль/мг белка

Сорт или мутант	Зоны роста корня					Эпикотиль
	меристема, I	зачатков корневых волосков, II	молодых корневых волосков, III	зрелых корневых волосков, IV	старых корневых волосков, V	
Рондо	4.9 ± 0.3	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.3
Nod3	90* ± 8.2	88* ± 8.1	72* ± 7.0	88* ± 8.2	80* ± 7.8	102* ± 9.8
K14	102* ± 9.8	106* ± 10.0	97* ± 9.0	94* ± 9.0	89* ± 8.0	98* ± 9.0

* Различия статистически значимы при сравнении сорта “Рондо” (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$.

влиянием штамма RCAM 1022 уровень H_2O_2 оставался близким к контролю во всех участках корня и эпикотиле, тогда как штамм 1845 индуцировал достоверное повышение этого показателя во всех зонах корня и эпикотиле (рис. 2).

Инфицирование оказывало также влияние на изменение эндогенной концентрации цАМФ в корнях проростков гороха. Инокуляция ризобиями корня проростков гороха Рондо в течение 5 мин вызывала последовательное незначительное повышение уровня цАМФ в I–V зонах, при этом в эпикотиле этот показатель оставался на уровне контроля. Под воздействием штамма 1845 концентрация цАМФ менялась аналогичным образом (рис. 3). Через 360 мин инфицирование штаммом RCAM 1022 вызывало наиболее значительное повышение уровня цАМФ в зонах зачатков и молодых корневых волосков (II–III зоны), при том, что в IV и V зонах и эпикотиле его концентрация оставалась на уровне контроля.

Штамм 1845 также индуцировал повышение уровня этой сигнальной молекулы, но менее интенсивное, чем штамм RCAM 1022 и почти одинаковое во всех участках корня и эпикотиле

(рис. 3). Инфицирование штаммом RCAM 1022 корня проростков Nod3 в течение 5 мин почти не повлияло на исходный уровень концентрации цАМФ. Через 360 мин этот показатель оставался практически на уровне контроля во всех участках корня. Однако штамм 1845 через 5 мин приводил к достоверному снижению уровня цАМФ во всех участках корня, в тоже время через 360 мин уровень цАМФ приближался к контролю. Инфицирование обоими видами бактерий проростков мутанта K14 в течение 5 мин практически не влияло на изменение уровня цАМФ в участках корня. Однако через 360 мин под воздействием штамма RCAM 1022 его значение возрастало практически в 2 раза почти во всех участках корня (рис. 3). Напротив, коинкубация со штаммом 1845 приводила к достоверному снижению уровня цАМФ в тех же участках корня.

В природе микроорганизмы способны к адгезии и созданию биопленок на любых поверхностях. По современным представлениям адгезия ризобий на корнях бобовых носит неспецифический характер и не зависит от их симбиотических свойств [12]. С этим трудно согласиться, поскольку

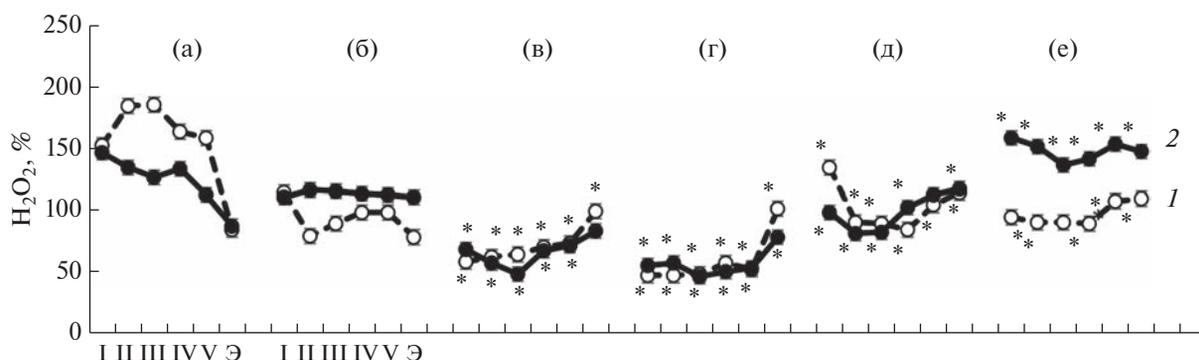


Рис. 2. Влияние инфицирования *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (1) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* (2) на концентрацию эндогенного пероксида водорода в участках корня (I–V, Э–эпикотиль) проростков гороха сорта Рондо (а, б) и его мутантов Nod3(в, г) и K14 (д, е) через 5 (а, в, д) и 360 (б, г, е) мин после инокуляции. * Различия статистически значимы при сравнении Рондо (контроль) с мутантами Nod3 или K14 по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$. ** Контроль – значения H_2O_2 из проростков, инкубированных на воде.

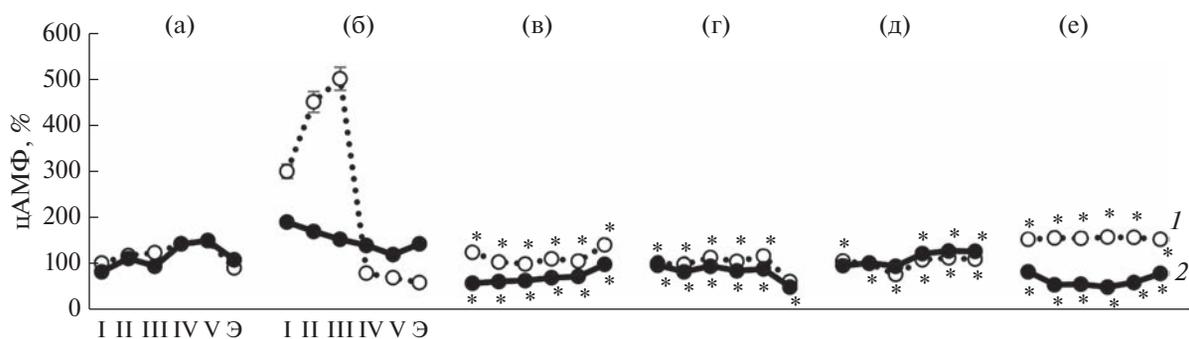


Рис. 3. Влияние инфицирования *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (1) или *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (2) на концентрацию эндогенного цАМФ в участках корня (I–V, Э–эпикотиль) проростков гороха сорта Рондо (а, б) и его мутантов Nod3(в, г) и K14 (д, е) через 5 (а, в, д) и 360 (б, г, е) мин после инокуляции. * Различия статистически значимы при сравнении варианта “Рондо” в качестве контроля с вариантом “Nod3” или вариантом “K14” по критерию Дункана, $n = 3$, $m \pm S.E.$; $P \leq 0.05$. ** При расчете эндогенных концентраций цАМФ контролем служила концентрация эндогенного цАМФ из проростков, инокулированных на воде.

ранее нами было показано, что штаммы ризобий, не эффективные по азотфиксации, но высококонкурентные, демонстрировали существенно более низкую адгезию на корнях проростков сорта Рондо [13]. Вероятно адгезия на ранней стадии инфицирования носит неспецифический характер, но переходит в специфическую стадию на этапе узнавания партнеров. В процессе адгезии со стороны бактерий могут принимать участие экзополисахариды, фимбрии IV и V типов, различные адгезины и флагеллины [14]. Такие детерминанты, необходимые на начальном этапе адгезии, представляют собой факторы вирулентности, и присутствуют практически у всех видов грамотрицательных бактерий, независимо от специализации [15, 16]. По-видимому, усиление адгезии ризобий через 360 мин коинкубации свидетельствует о переходе к специфической, необратимой стадии этого процесса, в которой принимают участие как некоторые структуры и метаболиты растений, так и экзометаболиты бактерий. Считается, что одними из основополагающих компонентов, определяющих специфичность азотфиксирующего симбиоза, являются Nod-факторы, представляющие собой липохитоолигосахариды, не только видо-, но и штаммоспецифичные [17]. В тоже время в этом процессе активное участие принимают лектины растений. Показано, что ген лектина гороха, внедренного в белый клевер, обеспечивал хорошую адгезию *Rhizobium leguminosarum* на его корнях, хотя этот вид микросимбионтов в природе никогда не инфицирует клевер [18]. Кроме того, сверхэкспрессия лектиновой части лектиноподобной рецепторной протеинкиназы бобовых может приводить к суперклебеньковому фенотипу [19]. Несмотря на то, что в работе не проводились соответствующие исследования, опираясь на литературные данные [18, 19], можно предположить, что разница в интенсивности адгезии ризобий на корнях проростков гороха сорта

Рондо и мутантов Nod3 и K14 в определенной степени связана с качественным составом выделяемых ими лектинов. Подтверждением этому может служить и то, что интенсивность адгезии штамма 1845 была близкой у обоих мутантов, а у проростков Рондо отсутствовала полностью через 360 мин, что свидетельствует о неспецифичности этого процесса для данного вида бактерий.

Тесный контакт корней проростков гороха с бактериями сопровождался существенными перестройками в сигналинге клеток растения. Несмотря на то, что генерация АФК в растениях индуцируется как симбиотическими азотфиксаторами, так и патогенами [20, 21], назначение, а также продолжительность подъема и амплитуда концентраций этих сигнальных молекул различны при воздействии различных видов микроорганизмов [22]. По литературным данным, на начальных этапах взаимодействия гороха с мутуалистическими бактериями наблюдался единичный пик генерации АФК, в том числе H_2O_2 , более сильный и продолжительный, чем при инфицировании патогенами [23]. Такой эффект наблюдался в экспериментах на проростках сорта Рондо при инокуляции штаммами RCAM 1022 или 1845 в течение 5 мин. По литературным данным на ранних этапах взаимодействия ризобии проявляют свойства патогенов, подавляя растительный иммунитет с помощью своих факторов вирулентности [23]. При бактериальных патогенезах пероксид водорода в растениях выполняет защитные функции и нарастание его концентрации происходит в две фазы, разделенные во времени [24]. Интересно, что у обоих мутантов изменение уровня пероксида водорода по зонам корня после кратковременного воздействия как ризобий, так и патогена было практически одинаковым и принципиально отличалось от такового в проростках сорта Рондо. Таким образом, уже на самых ранних этапах взаимодействия

как с мутуалистами, так и с патогенами очевидны перестройки в сигнальных системах мутантов гороха. Эти отличия более ярко проявлялись через 360 мин взаимодействия, когда этот процесс переходил в специфическую стадию, сопровождающуюся взаимным узнаванием партнеров. По литературным данным понижение уровня пероксида водорода в зонах адгезии и проникновения ризобий (зоны зачатков и молодых корневых волосков, II–III зоны) должно способствовать повышенной колонизации и вторжению ризобий в эти участки корня [25], что и происходит в проростках гороха сорта Рондо. В этом случае пероксид водорода, наряду с сигнальной ролью, выполняет функции антибактериального агента, распределяя инфекционную нагрузку по зонам корня. Штамм 1845, несмотря на отсутствие адгезии к 360 мин на корнях проростков сорта Рондо, был способен индуцировать незначительную окислительную вспышку за счет секретируемых токсинов, в частности, сириномицина. Этот экзометаболит способен влиять на работу кальциевых ионных каналов в мембране растительных клеток [26], что может привести к модуляции работы про- и антиоксидантных ферментов, тем самым влияя на уровень эндогенного пероксида водорода в тканях проростков гороха.

Однако у мутантов Nod3 и K14 динамика концентрации эндогенного H_2O_2 в зонах корня принципиально отличается не только от Рондо, но и между собой. Можно предположить, что существенное снижение уровня H_2O_2 во всех зонах корня проростков мутанта Nod3 через 360 мин коинкубации со штаммом RCAM 1022 является одной из причин суперклубенькового фенотипа. Однако такое же понижение уровня H_2O_2 под воздействием штамма 1845, вероятно, указывает на снижение локального неспецифического иммунитета в тканях корня. Это подтверждается уровнем данной сигнальной молекулы в эпикотиле, где он был близок к контролю. Это свидетельствует об отсутствии системной активации неспецифических защитных реакций в проростках мутанта Nod3. Напротив, у мутанта K14 под воздействием ризобий концентрация H_2O_2 на всем протяжении эксперимента сохранялась практически на уровне контроля, что также не типично для бобово-ризобиального симбиоза [20]. В тоже время под воздействием штамма 1845 наблюдалось существенное возрастание концентрации H_2O_2 , которое затрагивало все зоны корня и эпикотиль. Учитывая, что интенсивность адгезии этого патогена по зонам корня не одинакова, можно предположить, что при этом развивается системная реакция, причиной которой могут быть PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern), включающие флагеллярные и другие структурные белки патогена, а также его токсины (сириготоксин, коронатин, сири-

голин и др.), секретируемые в среду инкубации [27] и достигающие необходимой концентрации только к 360 мин.

Динамика концентрации цАМФ при инфицировании корней проростков гороха сорта Рондо и обоих мутантов принципиально отличалась от динамики эндогенного пероксида водорода (рис. 2, 3). Опираясь на литературные данные [28] и, сравнивая динамику данного вторичного мессенджера в проростках Рондо и мутантов, можно предположить, что эндогенный цАМФ участвует в регуляции эффективности симбиоза на начальных этапах взаимодействия. На этапе кратковременного взаимодействия (5 мин), вероятно это обусловлено PAMPs, характерными для обоих видов бактерий [15, 16]. Для распознавания PAMPs растения используют различные рецепторные молекулы, в том числе лектины, выполняющие функции рецепторов, а также комплексы рецепторных киназ на клеточной поверхности. Это усиливает защитную реакцию хозяина, хотя эффект, по-видимому, ослабляется при мутуалистическом симбиозе, поскольку Nod-факторы способны подавлять защитные ответы посредством прямого или косвенного взаимодействия с киназой рецептора лектина (LecRK) [12].

Обращает на себя внимание очень высокий уровень цАМФ в зонах зачатков и молодых корневых волосков проростков сорта Рондо через 360 мин после инокуляции штаммом RCAM 1022, и, напротив, отсутствие реакции аденилатциклазной сигнальной системы в зонах роста корня мутанта Nod3. По литературным данным у суперклубенькового мутанта бобов уровень цАМФ в корнях при инфицировании *Bradyrhizobium japonicum* оставался на уровне контроля в течение нескольких дней, в то время как искусственное повышение его концентрации негативно сказывалось на образовании клубеньков [28]. Учитывая, что у бесклубенькового мутанта этот показатель лишь на 40–60% превышал контроль, можно сделать предположение, что при интерпретации результатов следует учитывать интенсивность изменения уровня цАМФ и стадию инфекционного процесса. На этапе 360 мин происходит переход адгезии в специфическую стадию и начинается проникновение ризобий, сопровождающееся индукцией *sym*-генов растений [18]. Известно, что активация тех или иных генов зависит от концентрации вторичных мессенджеров, передающих сигналы на специфические факторы транскрипции [29]. Кроме того, ранее было показано, что при значительном повышении эндогенного уровня цАМФ существенно снижается концентрация эндогенного пероксида водорода в корнях проростков гороха сорта Рондо [5]. Такая обратная зависимость, хорошо прослеживаемая на корнях проростков сортового гороха, имеет не очень четко выраженный характер в корнях проростков его мутантов, что, воз-

можно, является одной из причин супер- или безклубеньковости. Это представляется вполне возможным, поскольку признак супернодуляции находится под контролем корня [30], и наиболее выраженные изменения в концентрациях цАМФ также наблюдаются в этом органе.

Если при ризобиальной инфекции изменение уровня эндогенного цАМФ в корне проростков гороха направлено на формирование мутуалистических отношений, то под воздействием патогена может быть показателем устойчивости к *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Литературные данные свидетельствуют о том, что изменение уровня цАМФ в растениях при инфицировании специфическими патогенами указывает на степень их устойчивости [31]. Можно предположить, что горох сорта Рондо наиболее устойчив к *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, поскольку уровень цАМФ во всех участках корня и эпикотиле существенно превышал показания в контроле, в отличие от мутантов.

Таким образом, мутации, направленные на регуляцию количества клубеньков у Nod3 и K14, оказывали влияние как на внутриклеточный сигналинг, существенно увеличивая концентрации эндогенных H₂O₂ и цАМФ, так и на иммунный ответ растений при взаимодействии с патогенами. У проростков этих мутантов гороха менялась интенсивность адгезии ризобий и фитопатогенных бактерий, а модуляция уровней эндогенных пероксида водорода и цАМФ скорее всего свидетельствовала об изменении устойчивости этих растений к специфическому патогену *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Возможно, что данный феномен в дальнейшем можно использовать для диагностики устойчивости вновь создаваемых мутантов и сортов гороха к возбудителю бактериального ожога, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власова Е.Ю., Сидорова К.К., Глянченко М.Н., Мищенко Т.М. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 4/2. С. 879–886.
2. Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N., Dunand C. // J. Integrative Plant Biology. 2010. V. 52. № 2. P. 195–204.
3. Torres M.A. // Physiologia Plantarum. 2010. V. 138. № 4. P. 414–429.
4. Ma W., Qi Z., Smigel A., Walker R.K., Verma R., Gerald A. Berkowitz G.A. // PNAS. 2009. V. 106. № 49. P. 20995–21000.
5. Ломоватская Л.А., Кузакова О.В., Гончарова А.М., Романенко А.С. // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 3. С. 270–277. <https://doi.org/10.1134/S0015330320020104>
6. Suzuki N., Katano K. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00490>
7. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. // Цитология. 2005. Т. 47. № 6. С. 519–525.
8. Ломоватская Л.А., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 4. С. 310–320.
9. Galletti R., Denoux C., Gambetta S., Dewdney J., F.M. De Lorenzo A., Ferrari S. // Plant. Physiol. 2008. V. 148. P. 1695–1706.
10. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. М.: Изд-во МГУ, 2005. 445 с.
11. Bleau J.R., Spoel S.H. // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 53–65.
12. Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tsyganov V.E. // Cells. 2021. V. 10. № 1050. P. 1–32.
13. Кузакова О.В., Ломоватская Л.А., Гончарова А.М., Романенко А.С. // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 5. С. 360–366.
14. Bhuvaneshwari T.V., Turgeon B.G., Bauer W.D. // Plant Physiol. 1980. V. 66. № 6. P. 1027–1031.
15. Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А. // Вестник новых медицинских технологий. 2008. № 4. С. 75–77.
16. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 2. С. 211–222.
17. Вершинина З.П., Лавина А.М., Чубукова О.В. // Биомика. 2020. Т. 12. № 1. С. 27–49. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2020-3>
18. Жуков В.А., Рычагова Т.С., Штарк О.Ю., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. // Экологическая генетика. 2008. Т. 6. № 4. С. 12–19.
19. Бабоша А.В. // Журн. общей биологии. 2008. Т. 69. № 5. С. 379–396.
20. Peleg-Grossman S., Melamed-Book N., Levine A. // Plant Signaling & Behavior. 2012. V. 7. № 3. P. 409–415.
21. Hawkins J.P., Oresnik I.J. // Front. Plant Sci. 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.796045>
22. Bleau J.R., Spoel S.H. // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 53–65. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab088>
23. Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G. // Trends in Plant Sci. 2015. V. 20. № 3. P. 186–194.
24. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Minibayeva F. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. № 372. P. 1367–1376.
25. Ca'rdenas L., Mart'nez A., Sa'nchez F., Quinto K. // Plant J. 2008. V. 56. P. 802–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03644.x>
26. Takemoto J.Y., Zhang L., Taguchi N., Tachikawa T., Miyakawa T. // Microbiology. 1991. V. 137. № 3. P. 653–659.
27. Ichinose Y., Taguchi F., Mukaihara T. // J. Gen. Plant Pathol. 2013. № 79. P. 285–296.
28. Terakado J., Fujihara S., Yoneyama T. // Soil Sci. & Plant Nutr. 2003. V. 49. № 3. P. 459–462.
29. Xu R., Guo Y., Peng S., Liu J., Li P., Jia W., Zhao J. // Biomolecules. 2021. V. 1. P. 688. doi.org/10.3390
30. Сидорова К.К., Шумный В.К. // Сибирский экологический журн. 1999. № 3. С. 281–288.
31. Sabetta W., Vandelle E., Locato V., Costa A., Cimini S., Moura A.B., Luoni L., Graf A., Viggiano L., De Gara L., Bellin D., Blanco E., de Pinto. M.C. // Plant J. 2019. V. 98. P. 590–606.

Influence of Bacterial Mutualists and Phytopatogenes on Changes in Concentrations of cAMP and H₂O₂ in Pea Seedles of Rondo Varieties and its Clutterless and Superclub Mutants

L. A. Lomovatskaya^{a, *}, O. V. Zakharova^a, A. M. Goncharova^a, and A. S. Romanenko^a

^a Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of RAS, Irkutsk, 664033 Russia

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

Changes in the concentrations of hydrogen peroxide and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the roots of seedlings of pea cv. Rondo and its supernodulating mutant Nod3 and anodulating K14 were studied during infection with *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* (strain RCAM 1022) or *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (strain 1845). It was shown that 360 min after infection of pea seedlings of the Rondo variety, the level of endogenous hydrogen peroxide slightly differed from the control. In the roots of Nod3 seedlings, this level significantly decreased, and in the roots of K14 it significantly increased when infected with the 1845 strain, but remained unchanged when exposed to bacteria of the RCAM 1022 strain. and young root hairs of Rondo seedlings, while strain 1845 had no effect on this parameter. Both types of bacteria had no effect on the concentration of cAMP in the roots of seedlings of the Nod3 mutant, whereas in K14, under the influence of RCAM 1022, the cAMP level almost doubled, and under the influence of 1845, it decreased. It is assumed that hydrogen peroxide and cAMP may be involved in the formation of supernodulating and nodulating phenotypes of mutants, as well as in the formation of resistance to a specific pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. It is possible that this phenomenon can be used to diagnose the resistance of newly created mutants and pea varieties to the blight pathogen.

Keywords: supernodulating pea mutant Nod3, anodulating pea mutant K14, pea cv. Rondo, H₂O₂, cAMP, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

УДК 543.55+543.94/.95

БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОСНОВА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ УДОБРЕНИЙ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

© 2023 г. Н. Ю. Юдина¹, Т. Н. Козлова¹, Т. Н. Абрамова², В. А. Арляпов¹,
Л. Д. Асулян¹, В. А. Алферов¹, А. Н. Решетиллов², *

¹Тульский государственный университет, Тула, 300012 Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Московская обл., 142290 Россия

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

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 30.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

На основе бактерий *Bacillus megaterium* и *Azotobacter chroococcum*, иммобилизованных в гидрогель модифицированного поливинилового спирта создано 2 биопрепарата. Показано, что при применении разработанных биопрепаратов происходит увеличение влажности почвы (в 2 раза), всхожести (до 100%), длины стебля и корня кресс-салата (на 15–30%). При применении биопрепарата на основе *Azotobacter chroococcum* происходило обогащение почвы азотом (в 2 раза). Жизнеспособность бактерий в гидрогеле на основе поливинилового спирта, модифицированного янтарной кислотой составляла более 30 сут, что позволило создать эффективные биоудобрения нового поколения на их основе.

Ключевые слова: поливиниловый спирт, дикарбоновые кислоты, биоудобрения, биопрепарат, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter chroococcum*

DOI: 10.31857/S0555109923020198, **EDN:** LVOQMF

В последние годы в сельском хозяйстве растет спрос на использование биоудобрений (препараты микробных культур), которые безопасны для окружающей среды. Они производятся в промышленных масштабах для различных растений, это такие известные препараты как “Нитрагин”, “Azotobakterins”, “Ризоторфин”, “Азофит” и “Азолен” (Россия), свойства которых зависят от используемых штаммов бактерий [1, 2].

Применение синтетических удобрений на основе азота, по оценкам исследователей, обеспечивает примерно половину мировых запасов продовольствия, и прогнозируется, что уровень потребления азотных удобрений возрастет с 80 до 180 млн т к 2050 г. [3], однако до 50% применяемых синтетических удобрений подвержены потерям в почве и окружающей среде. В связи с этим используют различные азотофиксирующие бактерии родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Glucanacetobacter*, *Clostridium*, *Methanosarcina*, которые способны преобразовывать молекулярный азот в ионы аммония – форму пригодную для усвоения растениями. Количество свободноживущих азотофиксирующих бактерий в почве не велико (<10⁴ КОЕ/г почвы) и они обеспечива-

ют поступление от 0.3 до 15 кг/Га в год азота в почву [4]. Особого внимания заслуживают биопрепараты на основе бактерий рода *Azotobacter*, поскольку они улучшают азотное питание, усиливают витаминный обмен, увеличивают доступность дополнительных питательных веществ (P, K и Zn), продуцируют биологически активные вещества, например гормоны роста растений, что способствует развитию растений, снижают возможность заражения растений грибными и бактериальными заболеваниями, хотя точный механизм действия, с помощью которого *Azotobacter* может усиливать рост растений, еще полностью не изучен [5]. Еще одним преимуществом бактерий рода *Azotobacter* является образование цист, за счет которых они способны сохранять жизнеспособность в окружающей среде (в сухой почве более 10 лет), что позволит использовать их для создания уникальных биоудобрений. На настоящий момент биоудобрения на основе *Azotobacter* (более 30 коммерческих биопрепаратов, в России Азолен, Азофит, Азотовит, Ризо, Азотобактер и др.) представляют самый большой сегмент мирового рынка биоудобрений. В 2017 г. он составлял 212.2 млн долларов и ожидается, что средне-

годовые темпы роста в течение 2020–2025 гг. составят 8.7% [1].

Помимо азотфиксирующих бактерий, в качестве биоудобрений в почву вносят фосфосолюбилизирующие, которые обеспечивают превращение нерастворимых фосфатов в растворимые, пригодные для использования растениями. Создано не менее 10 коммерческих биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* [2], в том числе в России, “Фосфобактерин” на основе спорозной палочки *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* [6]. При этом биопрепараты для обработки семян перед посадкой чаще всего используют в виде водной суспензии. Очевидно, что такие препараты достаточно быстро вымываются из почвы. Решением этой проблемы может быть иммобилизация применяемых микроорганизмов в гидрогели, образованные слабосшитыми полимерами.

Поливиниловый спирт (ПВС) является одним из наиболее популярных полимеров, используемых как биологически совместимые материалы в качестве основы гидрогелей [7–10]. Гидрогели на основе ПВС нашли широкое применение во многих сферах деятельности: медицине [11, 12], промышленности [13], сельском хозяйстве [14], биосенсорике [7–9, 15] и т.д. Макромолекулы ПВС имеют линейное строение, поэтому его гидрогели постепенно растворяются в воде. Для предотвращения этого процесса синтезируют сетчатые полимеры, за счет введения различных сшивающих агентов в зависимости от целей (N-винилпирролидон [7], сульфоянтарная кислота [16], глутаровый альдегид, формальдегид [17], лимонная и янтарная кислоты [18] и т.д.). При применении гелей ПВС в сельском хозяйстве особое внимание следует уделить таким сшивающим агентам, как дикарбоновые кислоты, так как янтарная кислота сама является удобрением [19].

Иммобилизация микроорганизмов различных родов (*Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*) в сшитый гидрогель модифицированного ПВС позволит создать инновационный увеличивающий плодородие почвы биопрепарат. Гидрогель к тому же позволяет удерживать большое количество влаги (частота полива может быть уменьшена до двух раз в месяц), а использование микроорганизмов позволит обеспечить растения необходимыми макроэлементами, стимулировать рост, развитие, цветение и созревание плодов.

Цель работы – разработка биопрепарата для удобрения почвы на основе гидрогеля модифицированного поливинилового спирта и почвенных бактерий *Bacillus megaterium* de Bary ВКМ В-847 и *Azotobacter chroococcum* Beijerinck 1901 ВКМ В-1616.

МЕТОДИКА

Получения ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном. Для получения поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном использовали 5%-ный водной раствор ПВС марки № 16/1 (Россия), водный раствор аммоний-церий (IV) нитрата $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (ч. д. а., ТУ 6-09-4762-84, Россия) в качестве инициатора и N-винилпирролидон (99%, “Acrosorganics”, США) в качестве сшивающего агента. Модификацию проводили при постоянном перемешивании в атмосфере азота при температуре 40°C.

Получение поливинилового спирта, модифицированного дикарбоновыми кислотами. К 5%-ному раствору ПВС при температуре 60°C добавляли навеску кислоты (янтарной, шавелевой, фумаровой) из расчета, что на 0.04 моль ПВС приходится 7.5×10^{-4} моль дикарбоновой кислоты [20].

Регистрация ИК-спектров. Регистрацию ИК-спектров образцов модифицированного ПВС в виде тонких пленок проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре ФМС 1201 (“Мониторинг”, Россия).

Определение доли сшитого ПВС. Определение доли сшитого полимера проводили методом экстракции. Для этого проводили взвешивание высушенного образца массой от 0.01 до 0.02 г, заливали водой и перемешивали в течение 2 ч при $t = 60^\circ\text{C}$. После экстракции воду отделяли центрифугированием и сушили исследуемые образцы до постоянной массы при 60°C. Экстракцию повторяли несколько раз до получения постоянной массы образца после высушивания. Эксперимент проводился для 15 образцов каждой пленки со статистической обработкой полученных данных. Процент потери веса определяли по формуле:

$$P = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%,$$

где m_1 – масса до экстракции, m_2 – масса высушенного гидрогеля после экстракции.

Определение степени набухания модифицированного ПВС. Для определения степени набухания навеску высушенного геля (0.01–0.02 г) взвешивали на аналитических весах и опускали на 5 мин в микропробирку, в которой находилось 1.5 мл дистиллированной воды. После этого набухший гель отделяли центрифугированием и взвешивали. Влагосодержание определяли высушиванием образца геля при температуре 120°C до постоянной массы.

Культивирование клеток микроорганизмов. Штаммы *Bacillus megaterium* ВКМ В-847 и *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1616 были получены во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН.

Бактерии *B. megaterium* культивировали аэробно 36–38 ч на жидкой глюкозо-пептонной пита-

тельной среде следующего состава (г/л): мясной пептон — 10, мясной экстракт — 10, NaCl — 5 (“Диаэм”, Россия). Бактерии *A. chroococcum* культивировали аэробно 72–90 ч на жидкой питательной среде Эшби, следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 0.2, сахараза — 5.0, NaCl — 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.2, K_2SO_4 — 0.2, $CaCO_3$ — 5.0.

Клетки культивировали аэробно в качалочных колбах объемом 750 см³ при температуре 28°C. Полученную биомассу отделяли центрифугированием при 10000 g при комнатной температуре 10 мин (центрифуга TG16WS, “Поликом”, Россия). Осадок промывали 20 мМ фосфатным буферным раствором, pH 6.8, ресуспендировали в буферном растворе и распределяли по микропробиркам типа Eppendorf, центрифугировали на центрифуге “Eppendorf” (Германия) 5 мин при 10000 g. Промытую биомассу хранили при температуре — 25°C в микропробирках.

Оценка дыхательной активности микроорганизмов. Для формирования рецепторного элемента на фрагмент целлюлозной диализной мембраны D9777 (“Sigma”, США) размером 1 × 1 см наносили 10 мкл суспензии бактерий, разбавленных в соотношении 1 : 1 соответствующим буферным раствором (титр бактерий *B. megaterium* B-847 в суспензии составлял 3×10^9 КОЕ/мл, а для бактерий *A. chroococcum* B-1616 — 6×10^8 КОЕ/мл). Закрепление биочувствительного элемента на электроде Кларка проводили с помощью полимерного кольца.

Формирование рецепторной системы биосенсора на основе иммобилизованных микроорганизмов в гидрогели ПВС. Для получения биокатализатора к 200 мкл гидрогеля модифицированного поливинилового спирта добавляли 20 мг сырой биомассы бактерий *B. megaterium* B-847. Равномерного распределения клеток в гидрогеле добивались встряхиванием смеси на центрифуге Skyline Elmi Centrifuge&Vortex CM70M (“ELMI”, Латвия) в течение 5 мин. Полученную суспензию переносили в планшет (d = 5 мм) и оставляли при 18–22°C до полного высыхания.

Биорецепторный элемент фиксировали на кислородном электроде при помощи нейлоновой сетки. Данная методика универсальна для всех модифицирующих агентов.

Проведение биосенсорных измерений. Электрохимические измерения проводили с использованием анализатора “Эксперт-009” (“Эконикс-Эксперт”, Россия), сопряженного с персональным компьютером, работающим под управлением специализированного программного обеспечения EXP2PR (“Эконикс-Эксперт”, Россия). Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов (мг/дм³ · с).

Преобразователями являлись кислородные электроды типа Кларка, содержащие иммобилизованные клетки микроорганизмов. Измерения выполнялись в кювете объемом 5 мл. Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буферный раствор, pH — 6.8, суммарная концентрация солей в котором составляла 20 мМ. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (150 об./мин).

Формирование биопрепарата на основе иммобилизованных микроорганизмов в гидрогели ПВС. Для получения биопрепарата к 1000 мкл гидрогеля модифицированного поливинилового спирта добавляли 100 мг сырой биомассы бактерий *B. megaterium* B-847 или *A. chroococcum* B-1616. Равномерного распределения клеток в гидрогеле добивались встряхиванием смеси на центрифуге Skyline Elmi Centrifuge&Vortex CM70M (“ELMI”, Латвия) в течение 5 мин. Полученную суспензию переносили на предметное стекло и оставляли при 18–22°C до полного высыхания. Высушенный биопрепарат измельчали ножницами и вносили в почву.

Биотестирование. Было сформировано 3 серии образцов с применением коммерческого удобрения “Зеба” с использованием разработанного биопрепарата и контроля. В качестве коммерческого удобрения выбран почвоулучшитель-суперабсорбент “Зеба” (“Щелково Агрохим”, Россия), в состав которого входят гель крахмал-поли (2-акриламидко-2-акриловая кислота), калиевая соль — 88% и мел — 12%. В качестве влагоудерживающего компонента в данном продукте выступает полимер на основе крахмала. Производитель обещает улучшение прорастания семян и рост рассады, сокращение количества поливов и расхода воды, более активное развитие корневой системы.

В 60 г предварительно прокаленной в течение 3 ч при 140°C почвы вносили 50 семян кресс-салата. После чего производился полив 50 мл дистиллированной воды. Гидрогели (коммерческий и разработанный биопрепарат) вносили в толщу почвы. Масса коммерческого аналога рассчитывалась согласно рекомендации производителя (0.5 г/л почвы, 0.12% по массе). Биотестирование проводилось в течение 7 сут. Измеряемыми параметрами были влажность почвы, всхожесть семян, высота стебля кресс-салата и длина корня [21].

Измерение влажности почвы производилось в соответствии с ГОСТ 28268-89.

Капиллярный электрофорез. Определение иона аммония в образцах почвы проводили в соответствии с ПНД Ф 16.1:2.2:2.3.74-2012. Анализ проводили с помощью системы капиллярного электрофореза “Капель-104Т” (Россия) и программного обеспечения “МультиХром 1.5x”

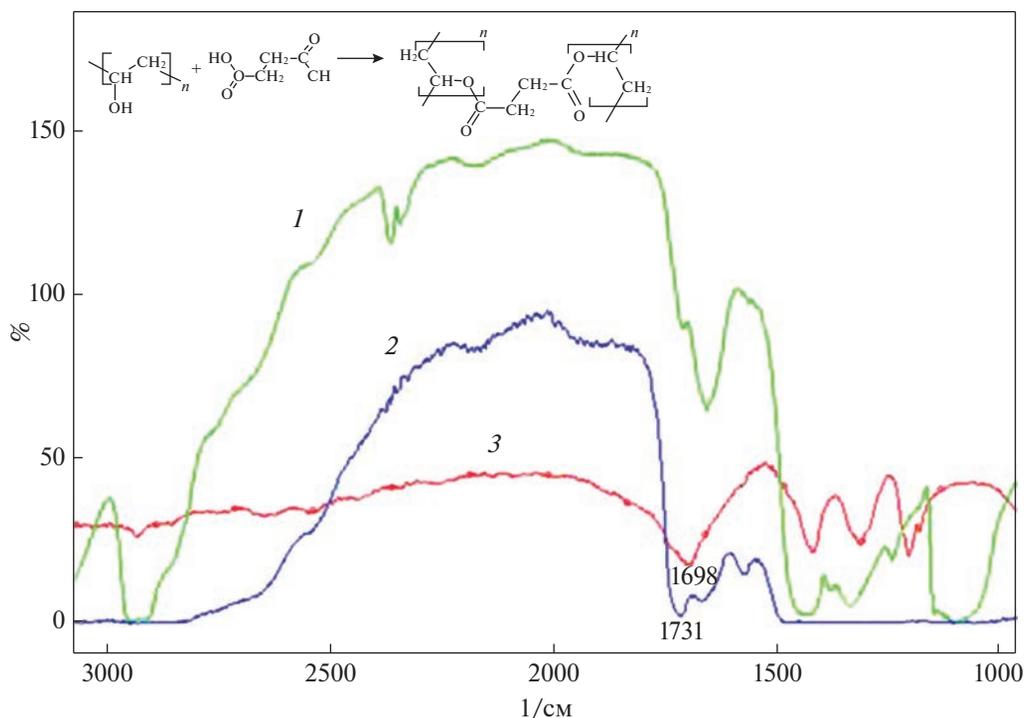


Рис. 1. ИК-спектр ПВС (1), ПВС, модифицированного янтарной кислотой (2) и янтарной кислоты (3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что гидрогели ПВС применяются в качестве носителей для иммобилизации микроорганизмов и ферментов [7–9, 15]. Иммобилизация микроорганизмов в гидрогели ПВС модифицированные дикарбоновыми кислотами позволяет создавать биопрепараты для улучшения почвы. В настоящей работе были отобраны бактерии вида *V. megaterium*, так как они являются фосфосольбилизующими бактериями, обеспечивающими превращение нерастворимых фосфатов в растворимые, пригодные для использования растениями [22]. Бактерии вида *A. chroococcum* – азотификсаторы, которые преобразуют молекулярный азот в ионы аммония – форму пригодную для усвоения растениями [1]. Таким образом, использование данных микроорганизмов обеспечит присутствие в

почве таких важных макроэлементов, как фосфор и азот.

Модификация поливинилового спирта. Для получения сетчатого полимера в качестве модифицирующих агентов использовали N-винилпирролидон и дикарбоновые кислоты: янтарную, фумаровую и щавелевую. На примере янтарной кислоты показана схема сшивки ПВС и ИК-спектр (рис. 1).

В ИК-спектре наблюдалось исчезновение полосы поглощения карбоксильной группы при 1698 см⁻¹ и появление полосы поглощения при 1731 см⁻¹, характерной для сложных эфиров. При 1695 см⁻¹ наблюдаются колебания ацетильной группы остаточного поливинилацетата. Для доказательства образования сетчатой структуры в синтезированных гидрогелях ПВС определяли долю сшитого полимера методом экстракции.

Таблица 1. Доля сшитого полимера и степень набухания модифицированных гидрогелей ПВС

Гидрогель (мольные соотношения)	Степень набухания Q, г/г	Доля сшитого полимера P, %
ПВС: янтарная кислота = 160 : 3	5 ± 1	50 ± 2
ПВС: фумаровая кислота = 160 : 3	4 ± 2	34 ± 5
ПВС: щавелевая кислота = 160 : 3	3 ± 1	33 ± 3
ПВС: инициатор : N-ВП = 160 : 7 : 1	11 ± 4	50 ± 3
ПВС: инициатор : N-ВП = 160 : 35 : 5	5 ± 1	60 ± 3
ПВС: инициатор : N-ВП = 160 : 70 : 10	3 ± 1	70 ± 10

Как видно из табл. 1, при увеличении доли N-винилпирролидона и инициатора в 10 раз в сополимере происходило увеличение доли сшитого полимера на 20% (с 50 до 70%). При увеличении содержания N-винилпирролидона и инициатора происходит уменьшение степени набухания гидрогеля с 11 до 3 г/г. Структура ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, описана в ранее опубликованной статье [7].

Наибольшей степенью сшивки при использовании дикарбоновых кислот обладал образец ПВС, модифицированный янтарной кислотой (50%), по сравнению с фумаровой (34%) и щавелевой (33%). Этот факт можно объяснить тем, что янтарная кислота, содержащая одинарные C–C связи, обладает более гибкой конфигурацией и способна взаимодействовать с гидроксильными группами ПВС при любом пространственном расположении этих групп, в отличие от фумаровой, обладающей жестким углеродным скелетом за счет двойных связей C=C. Все образцы ПВС, модифицированные дикарбоновыми кислотами, обладали сопоставимой степенью набухания.

Так как гидрогель будет использоваться в качестве основы для создания биопрепарата и служить в почве источником дополнительной влаги для растения, то важным показателем является степень набухания. На основании данного факта для дальнейших исследований была выбрана матрица на основе ПВС : инициатор : N-винилпирролидон в мольном соотношении 160 : 7 : 1, так как она обладала наибольшим значением этого показателя среди всех предложенных. В качестве второго гидрогеля для исследований был выбран ПВС, модифицированный янтарной кислотой, так как он обладал достаточными степенью набухания и долей сшивки, а сама янтарная кислота применяется в качестве удобрений в сельском хозяйстве.

Определение характеристик жизнеспособности микроорганизмов с использованием биосенсорного подхода. Подбор наиболее перспективной матрицы на основе модифицированного ПВС проводился с использованием бактерий *B. megaterium*. Для сравнения был выбран способ иммобилизации с применением диализной мембраны, так как он считается наиболее “мягким” и биоматериал не теряет своей активности. Предложенный подход к выбору биопрепарата основан на сравнительном анализе чувствительности микроорганизмов по отношению к окисляемым органическим субстратам как основной характеристике биокаталитической активности; стабильности в иммобилизованном состоянии как ключевой физиолого-биохимической характеристике и способности микроорганизмов окислять широкий круг веществ как ключевой метаболической характеристики. Таким образом, в качестве показателей жизнедеятельности микроорганизмов

были приняты следующие параметры биосенсора: долговременная стабильность, спектр окисляемых субстратов, нижняя граница определяемых концентраций. Данные характеристики отражают надежность фиксации бактерий в порах гидрогелях, наличие токсичного эффекта на микроорганизмы со стороны матрицы и возможные препятствия диффузии субстрата со стороны матрицы. Для определения достоверности биосенсорных измерений был использован показатель операционной стабильности, показывающий устойчивость ответа сенсора на одну и ту же концентрацию субстрата при проведении большого числа последовательных измерений [23].

Для оценки спектра окисляемых субстратов бактериями *B. megaterium* B-847 регистрировали отклик биосенсора на введение в измерительную кювету одинакового объема растворов субстратов (которые могут находиться в почве) с концентрацией 1 моль/дм³. Для трудно растворимых веществ применяли насыщенные растворы. Каждое измерение проводилось по 3 раза. Данные по спектру окисляемых субстратов бактериями *B. megaterium* при разных способах иммобилизации представлены на одной диаграмме (рис. 2).

Данные по спектру окисляемых субстратов представлены в процентах по отношению к максимальному отклику. При иммобилизации в диализную мембрану и гидрогель ПВС, модифицированный янтарной кислотой, максимальный ответ сенсора был получен на галактозу, а при использовании ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном, — на ксилозу. Анализируя данную диаграмму, можно сказать, что бактерии *B. megaterium* могут метаболизировать широкий круг субстратов, включая моно- и дисахариды, одноатомные и многоатомные спирты, органические кислоты и аминокислоты во всех случаях иммобилизации (рис. 2). Полученные результаты вполне согласуются с природой данных микроорганизмов, которые являются сапрофитами. Вне зависимости от способа иммобилизации бактерии окисляют все исследуемые субстраты, а значит, включение в гель не влияет на ферментативные системы микроорганизмов.

На основании полученных данных (табл. 2 и рис. 2) можно сказать, что значительного отличия в параметрах жизнедеятельности бактерий *B. megaterium* при различных способах иммобилизации не обнаружено. Биосенсоры обладают высокой долговременной стабильностью (более 20 сут), сопоставимой операционной стабильностью (относительное отклонение не более 8%), широким спектром окисляемых субстратов (20 субстратов) и довольно низким значением нижней границы определяемых концентраций глюкозы (0.004 ммоль/дм³). На основании данных показателей можно сделать вывод, что поливиниловый спирт, модифицирован-

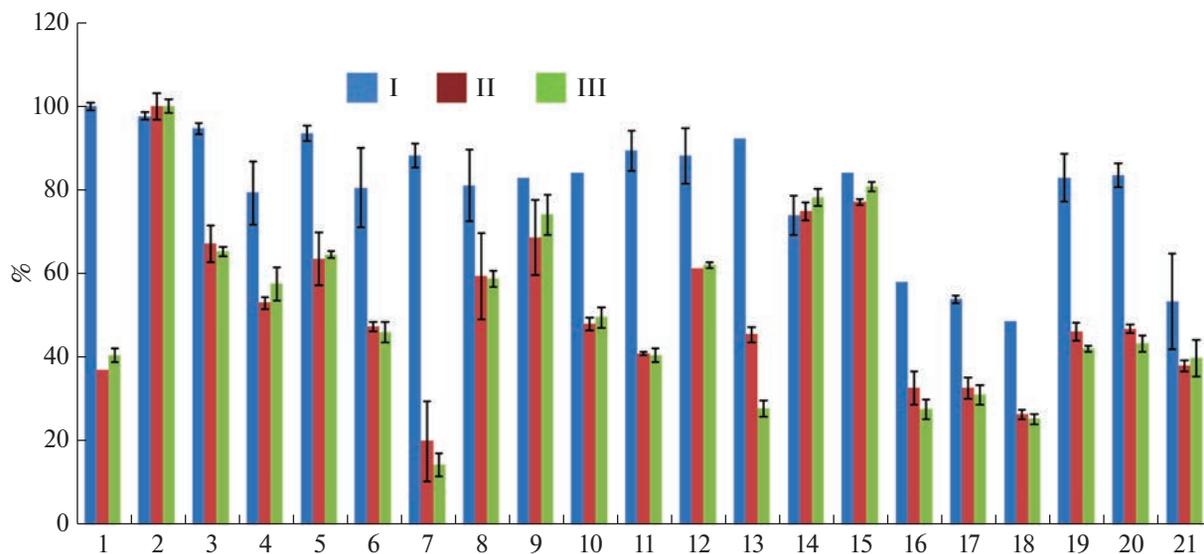


Рис. 2. Спектр субстратов (1–21), окисляемых бактериями *B. megaterium* В-847, иммобилизованными в ПВС : N-ПВ (I), ПВС : янтарная кислота (II) и на диализной мембране (III): 1 – ксилоза, 2 – галактоза, 3 – глюкоза; 4 – манноза, 5 – фруктоза, 6 – сахароза, 7 – лактоза, 8 – этанол, 9 – глицерин, 10 – мочеви́на, 11 – глицин, 12 – серин, 13 – тирозин, 14 – аргинин, 15 – глутамин, 16 – аспаргиновая кислота, 17 – глутаминовая кислота, 18 – этановая кислота, 19 – пропандиовая кислота, 20 – бутандиовая кислота, 21 – аскорбиновая кислота.

ный янтарной кислотой и N-винилпирролидонном надежно фиксирует бактерии *B. megaterium*, не оказывая на них токсичного влияния, не затрудняет диффузию субстрата и не оказывает влияние на ферментативные системы клеток, а значит может быть использован в качестве иммобилизующей матрицы для создания биопрепарата. Для дальнейших исследований был выбран биопрепарат на основе ПВС, модифицированного янтарной кислотой, так как данный гидрогель требует меньше временных и экономических затрат при синтезе, биокатализатор обладал наибольшей долговременной стабильностью, кроме того янтарная кислота может применяться в качестве удобрения. Проведена иммобилизация бактерий *A. chroococcum* в выбранную матрицу и на основании биосенсорных измерений показана высокая жизнеспособность в ней микроорганизмов. Долговременная стабильность составила 26 сут,

нижняя граница определяемых концентраций – 0.006 ммоль/дм³.

Биотестирование созданных биопрепаратов. В качестве тест-объекта были использованы семена кресс-салата в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:4.19-2013. В табл.3 представлены результаты биотестирования, проведенные на кресс-салате.

Как видно из приведенных в табл.3 результатов, добавление 0.06% по массе биопрепарата на основе модифицированного ПВС и бактерий в почву дает результаты сравнимые с коммерческим гидрогелем. При увеличении дозы биопрепарата до 0.12 и 0.24% наблюдалось значительное увеличение корневой системы, высоты стебля и всхожести. Разработанный биопрепарат на основе гидрогеля ПВС способен удерживать влагу в почве лучше коммерческого образца.

Для образцов на основе биопрепарата с *A. chroococcum* методом капиллярного электрофореза

Таблица 2. Характеристики биосенсоров на основе бактерий родов *Bacillus* и *Azotobacter*

Характеристика биосенсора/способ иммобилизации	Бактерии <i>B. megaterium</i>			Бактерии <i>Azotobacter</i> ПВС : янтарная кислота
	ПВС : N-ВП	ПВС : янтарная кислота	диализная мембрана	
Операционная стабильность по 15 измерениям, %	7.5	7.9	7.2	8.6
Долговременная стабильность, сут	26	35	23	26
Нижняя граница определяемых концентраций глюкозы, моль/л	0.002	0.002	0.004	0.006

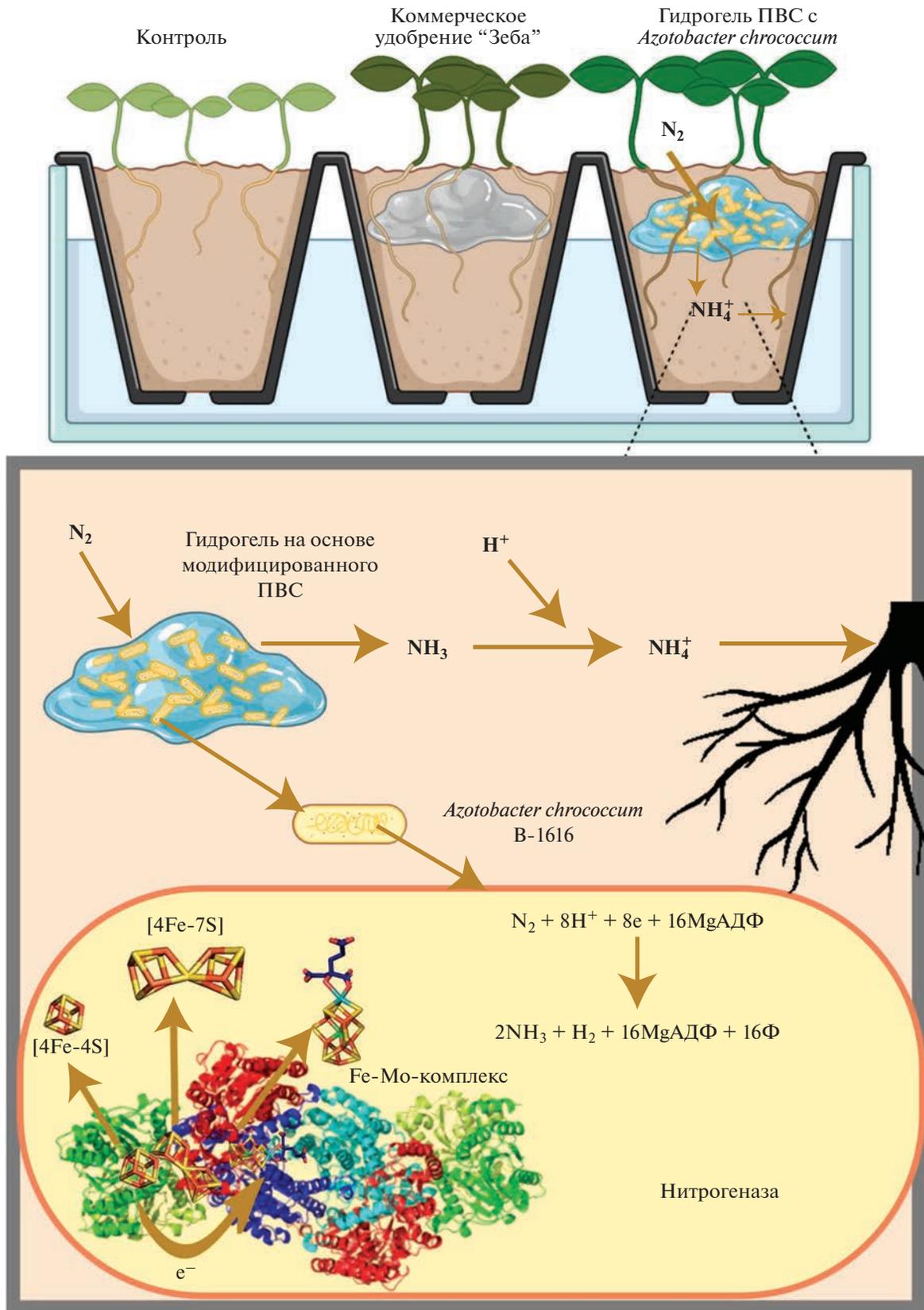


Рис. 3. Схема работы созданного биорепарата на основе бактерий *Azotobacter chroococcum*.

Таблица 3. Биотестирование созданных биопрепаратов на основе бактерий *B. megaterium* и *A. chroococcum*

Вариант	Высота стебля, мм	Длина корня, мм	Всхожесть, %	Влажность через 7 сут, %	Начальное содержание ионов NH ₄ ⁺ , мг/кг	Содержание ионов NH ₄ ⁺ через 7 сут, мг/кг
Контроль	17 ± 1	12 ± 1	53 ± 7	5 ± 1	24 ± 2	14 ± 2
Гидрогель “Зеба” (0.12%)	24 ± 2	12 ± 2	79 ± 3	7 ± 1	25 ± 2	15 ± 2
Биопрепарат на основе бактерий <i>B. megaterium</i>						
ПВС : янтарная кислота						
0.06%	28 ± 6	12 ± 2	90 ± 6	14.1 ± 0.5	–	–
0.12%	29 ± 5	26 ± 2	100 ± 0	18.7 ± 0.3	–	–
0.24%	33 ± 6	29 ± 2	100 ± 0	22.7 ± 0.4	–	–
Биопрепарат на основе бактерий <i>A. chroococcum</i>						
ПВС : янтарная кислота						
0.06%	25 ± 1	38 ± 2	89 ± 4	7 ± 2	23 ± 2	24 ± 2
0.12%	25 ± 1	44 ± 3	89 ± 4	9 ± 1	24 ± 2	28 ± 3
0.24%	25 ± 1	46 ± 3	89 ± 2	12 ± 2	24 ± 2	27 ± 2

установлено присутствие ионов NH₄⁺, поскольку данные микроорганизмы фиксируют азот в виде ионов аммония [1]. На рис. 3 представлена схема действия разработанного биопрепарата на основе бактерий *A. chroococcum*, иммобилизованных в гидрогель ПВС, модифицированного янтарной кислотой.

В контрольном образце после 7 сут экспозиции наблюдалось снижение концентрации ионов аммония в почве на 42% (с 24 до 14 мг/г), при использовании коммерческого препарата “Зеба” так же происходило снижение их концентрации, так как эти образцы не содержали азотфиксирующих микроорганизмов. При использовании разработанного биопрепарата на основе бактерий *A. chroococcum* происходило незначительное увеличение содержания ионов аммония, что подтверждало жизнеспособность бактерий *A. chroococcum*, иммобилизованных в гидрогель ПВС, модифицированного янтарной кислотой. Фиксация атмосферного азота бактериями *Azotobacter* осуществлялась под действием фермента нитрогеназы, который необратимо окисляется под действием кислорода (но в клетке находится в защищенном виде) [24]. В соответствии со схемой, представленной на рис. 3, ферментный комплекс состоит из двух ферментов: собственно нитрогеназы (называемой также Mo-Fe-белком, в состав кофактора входит два атома молибдена) и гидрогеназы (Fe-белок или редуктаза нитрогеназы). Эти два компонента белка действуют вместе и катализируют восстановление азота до аммиака.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что разработанный био-

препарат не уступает коммерческому аналогу, а по некоторым показателям превосходит его и может быть рекомендован в качестве влагоудерживающего и обогащающего почву макроэлементами биопрепарата.

Синтезированы матрицы на основе ПВС и различных сшивающих агентов (N-винилпирролидон и дикарбоновые кислоты) и определены доля сшитого полимера и степень набухания. Наиболее перспективным гидрогелем для создания биоудобрений является ПВС, модифицированный янтарной кислотой, доля сшитого полимера в котором составила 50 ± 2%, степень набухания – 5 ± 1 г/г. На основании биосенсорных измерений доказана жизнеспособность микроорганизмов *B. megaterium* и *A. chroococcum* в разработанных матрицах, что позволит использовать их для создания биоудобрений. Показано, что при использовании обоих биопрепаратов на основе бактерий происходило улучшение таких характеристик как всхожесть, влажность, длина стебля, длина корня, а биопрепарат на основе *A. chroococcum* значительно обогащал почву азотом (в 2 раза). Разработанные биоудобрения могут служить прототипом для создания высокоэффективного биоорганического коммерческого удобрения нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., Meftah Kadmiri I. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 354–372.
2. Saxena A.K., Kumar M., Chakdar H., Anuroopa N., Bagyaraj D.J. // *J. Applied Microbiol.* 2020. V. 128. № 6. P. 1583–1594.
3. Bindraban P.S., Dimkpa C., Nagarajan L., Roy A., Rabbinge R. // *Biol. and Fertility of Soils.* 2015. V. 51. № 8. P. 897–911.
4. Saha B., Saha S., Das A., Bhattacharyya P.K., Basak N., Sinha A.K., Poddar P. // In “Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture.” Singapore: Springer, 2017. P. 81–128.
5. Sumbul A., Ansari R.A., Rizvi R., Mahmood I. // *Saudi J. Boil. Sciences.* 2020. V. 27. № 12. P. 3634–3640.
6. Гинь Т.А., Соколова М.Т., Казаринова Т.Ф. // *Изв. Вузов. Прикл. хим. и биотехнол.* 2012. № 2. С. 68–73.
7. Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Asulyan L.D., Kamanina O.A., Alferov S.V., Shumsky A.N., Reshetilov A.N. // *3 Biotech.* 2020. V. 10. № 5. P. 1–11.
8. Arlyapov V.A., Yudina N.Yu., Asulyan L.D., Alferov S.V., Alferov V.A., Reshetilov A.N. // *Enzyme and Microbial Technol.* 2013. № 53. P. 257–262.
9. Yudina N.Yu., Arlyapov V.A., Cherpurnova M.A., Alferov S.V., Reshetilov A.N. // *Enzyme and Microbial Technol.* 2015. № 78. P. 46–53.
10. Асулян Л.Д., Бояркина В.В., Агаева М.В. Гидрогели поливинилового спирта как влагоудерживающие сорбенты // *Изв. Тул. ГУ Естеств. науки.* 2021. № 1. С. 13–19.
11. Kamoun E.A., Loutfy S.A., Hussein Y., Kenawy E.R.S. // *Intern. J. Biological Macromolecules.* 2021. V. 187. P. 755–768.
12. Husain M.S.B., Gupta A., Alashwal B.Y., Sharma S. // *Energy Sources. Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects.* 2018. V. 40. № 20. P. 2388–2393.
13. Alipoori S., Mazinani S., Aboutalebi S.H., Sharif F. // *J. Energy Storage.* 2020. V. 27. P. 101072.
14. Arefian M., Hojjati M., Tajzad I., Mokhtarzade A., Mazhar M., Jamavari A. // *J. Composites and Composites.* 2020. V. 2. № 3. С. 69–76.
15. Wen N., Jiang B., Wang X., Shang Z., Jiang D., Zhang L., Guo Z. // *The Chemical Record.* 2020. V. 20. № 8. P. 773–792.
16. Rynkowska E., Fatyeyeva K., Marais S., Kujawa J., Kujawski W. // *Polymers.* 2019. V. 11. № 11. P. 1799.
17. Ahmad A.L., Yusuf N.M., Ooi B.S. // *Desalination.* 2012. V. 287. P. 35–40.
18. do Nascimento F.C., de Aguiar L.C.V., Costa L.A.T., Fernandes M.T., Marassi R.J., Gomes A.D.S., de Castro J.A. // *Polymer Bulletin.* 2021. V. 78. № 2. P. 917–929.
19. Нораев М.Г., Машенцева Н.Г. // *Роль технических наук в развитии общества.* 2017. С. 158–163.
20. Степин С.Г., Дикусар Е.А. // *Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации.* Витебск: УО “Витебский государственный медицинский университет”, 2015. С. 174–175.
21. Сидоренко О.Д. // *Агрохимия.* 2012. № 11. С. 48–51.
22. Saeid A., Prochownik E., Dobrowolska–Iwanek J. // *Molecules.* 2018. V. 23. № 11. P. 2897.
23. Харьковская А.С., Арляпов В.А., Туровская А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетиллов А.Н. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 2. С. 199–209.
24. Hakeem K.R., Sabir M., Ozturk M., Akhtar M., Ibrahim F.H. // *Reviews of Environment. Contamination and Toxicology.* 2016. V. 242. P. 183–217.

Immobilized Microorganisms-based Biopreparation as a Major Component for New Generation High-efficiency Organic Fertilizers

N. Yu. Yudina^a, T. N. Kozlova^a, T. N. Abramova^b, V. A. Arlyapov^a,
L. D. Asulyan^a, V. A. Alferov^a, and A. N. Reshetilov^{b, *}

^a Tula State University, Tula, 300012 Russia

^b Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms, Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal Research Center, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

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

Two biopreparations made of the bacteria *Bacillus megaterium* and *Azotobacter chroococcum* immobilized in modified polyvinyl alcohol hydrogel have been created. It has been shown that after application of the constructed biopreparations, an increase in soil moisture content (by a factor of two), germination (by up 100%), the length of the cress stem and roots (15–30%) was achieved. The addition of *Azotobacter chroococcum*-based biopreparation led to a 2-time increase of nitrogen in soil. The survival period for bacteria immobilized in hydrogel based on polyvinyl alcohol modified with succinic acid was longer than 30 days. It is concluded that the studied biopreparation exhibited high potential as a major material for efficient biofertilizer of new generation.

Keywords: polyvinyl alcohol, dicarbonic acids, biofertilizer, biopreparation, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter chroococcum*