

*Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»*

На правах рукописи



СТАЦЕНКО ВАРВАРА НИКОЛАЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ С ПЛЕЙОТРОПНЫМ ЭФФЕКТОМ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ
НЕРИБОСОМАЛЬНОГО СИНТЕЗА У СПОРОВЫХ БАКТЕРИЙ**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону
2026

Работа выполнена в Молодежной лаборатории «Молекулярная генетика микробных консорциумов», лаборатории «Биотехнологический кластер» и на кафедре генетики Академии биологии и медицины им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет».

Научный руководитель:

Празднова Евгения Валерьевна,

доктор биологических наук, заведующая лабораторией «Биотехнологический кластер» Академии биологии и медицины им. Д.И. Ивановского ЮФУ (Ростов-на-Дону)

Официальные оппоненты:

Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики Московского физико-технического университета (МФТИ)

Марсова Мария Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится **30 сентября 2026 г. в 12:30** на заседании диссертационного совета ЮФУ 801.01.23 по биологическим наукам на базе Академии биологии и медицины им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, к. 712.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю.А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Р. Зорге, 21Ж и на сайте Южного федерального университета <https://hub.sfedu.ru/diss/show/1356959/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Отзыв на автореферат в 2-х экз. (с указанием даты, полностью ФИО, учёной степени со специальностью, званием, организации, подразделения, должности, адреса, телефона, e-mail), заверенный печатью организации, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к. 106, ученому секретарю диссертационного совета ЮФУ 801.01.23 Хмелевцовой Л.Е., а также в формате .pdf на e-mail: lehmelevcova@sfedu.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, с.н.с.



Л.Е. Хмелевцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Известно, что многие спорообразующие бактерии, в частности представители родов *Bacillus* и *Paenibacillus* являются продуцентами широкого спектра вторичных метаболитов, которые обуславливают их антибактериальную, иммунодепрессивную, противогрибковую и противоопухолевую активность (Grady E. N. et al., 2016). Применение бацилл и пенибацилл способствует росту полезных сельскохозяйственных растений, включая огурцы, томаты, кукурузу и многие другие за счет контроля фитопатогенов, таких как *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* и *Phytophthora capsici* (Naing K. W. et al., 2014).

B. subtilis хорошо известен производством циклических липопептидов, проявляющих сильную поверхностно-активную и антимикробную активность, таких как сурфактины, итурины и фенгицины. Известно несколько макролидов, полученных из поликетидов, а также нерибосомальных пептидов, дигидроизокумаринов и линейных липопептидов с антимикробными свойствами, что демонстрирует биосинтетический арсенал этой бактерии (Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M., 2019).

Связанные с растениями виды *Paenibacillus* могут напрямую влиять на рост растений, производя индол-3-уксусную кислоту (ИУК) и другие ауксиновые фитогормоны, солубилизируя недоступный фосфор в форму, которая может усваиваться корнями растений, а некоторые виды также могут фиксировать атмосферный азот (Weselowski et al., 2016). Более 20 видов *Paenibacillus* являются азотфиксирующими. Кроме того, *Paenibacillus* способны к контролю фитопатогенов, вызывая индуцированную системную резистентность (ISR) и/или производя различные биоцидные вещества. ISR — это защитный механизм, возникающий в тканях растений и обеспечивающий усиленную защиту от ряда патогенов. ISR может привести к повышению уровня салициловой кислоты (SA-зависимый ответ) или к SA-независимому ответу (усиленное отложение каллозы). Среди видов *Paenibacillus* ISR была продемонстрирована для *P. polymyxa*, *P. alvei*, *P. elgii* и *P. lentimorbus*. Было показано, что виды *Paenibacillus* убивают личинок насекомых-вредителей, включая жуков и чешуекрылых (Sharma et al., 2013; Neung et al., 2014).

Однако продукция целевых веществ в природных штаммах зачастую невысока и/или нестабильна, поэтому для использования данных штаммов в биопрепаратах и биотехнологии остро стоит проблема создания штаммов-высокоэффективных продуцентов. Одним из путей является воздействие на ключевые гены бактерий, имеющие множественные (плейотропные) эффекты.

Явление плейотропии возникает, когда один ген влияет на два или более фенотипических признака. Мутация в таком гене может оказывать влияние на несколько признаков одновременно из-за того, что продукт гена взаимодействует с несколькими другими белками или катализирует несколько реакций. Известно, что мутации в некоторых генах, таких, как *rpoB* (ген субъединицы критически важного фермента РНК-полимеразы), вызывают различные физиологические изменения у бактерий. Это связано с тем, что РНК-полимераза участвует в реализации генетической информации и таким образом влияет на работу всех остальных генов бактерии.

К примеру, в бактериях, которые используются для производства природных антибиотиков, таких, как эритромицин (*Saccharopolyspora erythraea*) и ванкомицин (*Amicyclolopsis orientalis*), определенные мутации в гене *rpoB* могут увеличивать выработку данных антибиотиков (Koch, 2014). Было обнаружено, что каждое изменение аминокислоты

в субъединице РНК-полимеразы приводит к собственному уникальному спектру воздействия на рост и развитие *Bacillus subtilis*, включая споруляцию, прорастание и способность к трансформации (Maughan, 2004). Также выяснено, что мутанты H485R и H485D продуцируют значительно большее количество итуринина А по сравнению с диким штаммом, что обуславливает их противогрибковую активность (Cai, 2017).

Однако такие изменения не являются универсальными для всех бактерий. Точечное воздействие на ген *groB*, как и на другие гены с плеiotропным действием, представляется перспективным направлением в биотехнологии бактерий-продуцентов антибиотиков. Однако спектр этих эффектов на разных видах и штаммах *Bacillus* и *Paenibacillus* мало изучен и требует анализа с применением молекулярно-генетических методов, чтобы выбрать наиболее оптимальную стратегию для биоинженерии продуцентов и избежать нежелательных побочных эффектов.

В ранее выполненной дипломной работе было изучено плеiotропное действие гена *groB* на устойчивость к антибиотикам и синтез вторичных метаболитов. А также выяснено, что ДНК-протекторная и SOS-ингибирующая активность у мутантов *B. subtilis* KATMIRA1933 и *B. amyloliquefaciens* B-1895, устойчивых к рифампицину, значительно выше, чем у контрольных штаммов. Но по большей части бактериальные гены с плеiotропными эффектами изучены недостаточно. Поэтому в данном диссертационном исследовании был расширен спектр изучаемых генов с плеiotропным эффектом и штаммов-продуцентов, перспективных для биотехнологии.

Степень разработанности темы исследования. Изучение вторичного метаболизма спорообразующих бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* представляет одно из наиболее активно развивающихся направлений современной микробиологии и биотехнологии. К настоящему времени накоплен значительный объём сведений о биосинтетическом потенциале данных микроорганизмов: подробно охарактеризованы основные классы нерибосомальных пептидов и поликетидов. Тем не менее плеiotропные эффекты мутаций в гене *groB*, а также в других регуляторных генах — в частности, *abrB* и *csrA* — на уровень нерибосомального синтеза и комплекс физиологических свойств штаммов *Bacillus* и *Paenibacillus* изучены фрагментарно. Остаётся невыясненным, в какой мере установленные закономерности универсальны для различных видов и штаммов, каков характер сопутствующих мутаций, возникающих на фоне целевых изменений, и как состав питательной среды — в первую очередь источник углерода — влияет на интенсивность экспрессии ключевых регуляторов вторичного метаболизма.

Цели и задачи исследования. Целью данного исследования являлось изучение влияния генов с плеiotропным эффектом на эффективность нерибосомального синтеза у споровых бактерий.

Задачи исследования:

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Получить мутантов, устойчивых к различным антибиотикам за счет изменений в ключевых генах с плеiotропным эффектом, таких, как *groB*, с помощью мутагенеза и последующего отбора на селективных средах.
2. Изучить эффективность нерибосомального синтеза, продукцию полезных метаболитов и другие ключевые свойства у штаммов-мутантов по сравнению с диким типом.

3. Установить локализацию и характер мутаций в целевых генах, а также сопутствующих мутаций с помощью полногеномного секвенирования.
4. Изучить корреляцию экспрессии генов-регуляторов с плеiotропным эффектом (*ssrA*, *abrB*) с эффективностью нерибосомального синтеза.
5. Провести сравнительную оценку влияния плеiotропных мутаций в разных ключевых генах на образование и выход вторичных метаболитов и определить наиболее перспективные гены для будущих генно-инженерных модификаций.

Научная новизна.

Впервые получены Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens* B1895, *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, *Bacillus subtilis* C65A, C65B, *Bacillus halotolerans* C 76.2, *Bacillus spp.*- C15, C 49.1A, *Bacillus licheniformis* CL 33, CL 35, *Bacillus safensis* CL 56) и *abrB*-делеционные мутанты штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B1895, характеризующиеся улучшенными антиоксидантными, ДНК-протекторными и противогрибковыми свойствами.

Установлена связь между мутациями в гене *abrB* и усилением антиоксидантной, антимутагенной и SOS-ингибирующей активности.

Впервые проведён сравнительный анализ влияния источников углерода (крахмал, пектин, глюкоза) на экспрессию гена *ssrA* у бацилл, установлена зависимость биосинтеза вторичных метаболитов от состава питательной среды.

Теоретическая и практическая значимость работы. Современное сельскохозяйственное производство находится перед необходимостью одновременного решения двух ключевых задач: обеспечения надёжной защиты культурных растений от фитопатогенов, вредителей и сорной растительности, а также минимизации техногенной нагрузки на окружающую среду. В этом контексте одним из ведущих направлений в мировом растениеводстве становится биологизация земледелия — системный подход, направленный на последовательное сокращение применения химических средств защиты растений.

Особую актуальность в настоящее время приобретает поиск и создание новых штаммов-продуцентов вторичных метаболитов, перспективных для разработки на их основе биологических препаратов сельскохозяйственного назначения. Подобные биопрепараты открывают широкие возможности для повышения почвенного плодородия и проведения биоремедиации загрязнённых территорий, что в целом соответствует курсу на экологизацию аграрного производства. Развитие данного направления способно не только укрепить позиции России в области сельскохозяйственной биотехнологии, но и создать предпосылки для формирования новых экономических компетенций в сфере управления почвенными ресурсами.

Впервые получены Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens* B1895, *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, *Bacillus subtilis* C65A, C65B, *Bacillus spp.*- C15, C 49.1A, C 76.2, *Bacillus licheniformis* CL 33, CL 35, *Bacillus safensis* CL 56) и *abrB*-делеционные мутанты штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B1895, характеризующиеся улучшенными антиоксидантными, ДНК-протекторными и противогрибковыми свойствами.

Установлена связь между мутациями в гене *abrB* и усилением антиоксидантной, антимутагенной и SOS-ингибирующей активности.

Впервые проведён сравнительный анализ влияния источников углерода (крахмал, пектин, глюкоза) на экспрессию гена *ssrA* у бацилл, установлена зависимость биосинтеза вторичных метаболитов от состава питательной среды.

Практическая значимость.

1. Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* являются перспективной основой для получения постбиотических препаратов в условиях биореактора с улучшенными противогрибковыми и протекторными свойствами.
2. *abrB*-делеционные мутанты штамма B1895 могут быть использованы в биотехнологическом производстве вторичных метаболитов с повышенной биологической активностью, однако практическое применение потребует обязательной сертификации в соответствии с требованиями, предъявляемыми к генетически модифицированным организмам.
3. Полученные данные о влиянии источников углерода на экспрессию гена *csrA* могут быть использованы при разработке оптимизированных питательных сред, обеспечивающих направленную регуляцию биосинтеза целевых метаболитов у бацилл.

Положения, выносимые на защиту.

1. Мутации в *groV*, приводящие к рифампицин-резистентности (Rif^R), значительно усиливают протекторную и противогрибковую активность штаммов за счет увеличения выхода вторичных метаболитов.
2. Делеция гена *abrB* снимает репрессию вторичного метаболизма и способствует усилению протекторных, антимутагенных и противогрибковых свойств у бактерий рода *Bacillus*.
3. Синтез вторичных метаболитов эпигенетически сопряжён с углеродной катаболитной репрессией (CCR): замена глюкозы в питательной среде сложными углеводами ослабляет CCR и индуцирует продукцию биоактивных соединений, что отражает переключение клеток на стратегию выживания.

Апробация результатов исследований. Материалы диссертации были представлены на 5 российских и международных конференциях: в рамках II Школы молодых ученых ДГТУ, доклад «Influence of rifampicin-resistance mutations on the synthesis of antioxidant, DNA-protective, and SOS-inhibitory metabolites» 21 октября, 2024 г., г. Ростов-на-Дону; III Школы молодых ученых ДГТУ, доклад «Regulation of Non-Ribosomal Peptide Synthesis Gene Expression in Spore-Forming Bacteria» 18 апреля, 2025 г., г. Ростов-на-Дону; на XIX Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса» («ИнтерАгро 2026») 25–27 февраля 2026 г., г. Ростов-на-Дону, доклад «Механизмы регуляции нерибосомального синтеза у споровых бактерий»; VIII Международном симпозиуме «Innovations in Life Sciences» 28-29 мая 2026, г. Белгород, тезисы «Регуляция нерибосомального синтеза у споровых бактерий»; II конференции Ростовского общества генетиков и селекционеров «Фундаментальные и прикладные аспекты генетики и селекции» 27 мая 2026 г., г. Ростов-на-Дону, тезисы «Инактивация гена *abrB* повышает продукцию вторичных метаболитов у бацилл».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 1 статья в научных изданиях, входящих в Перечень ВАК, 3 статьи в научных изданиях, входящих в Scopus, Web of Science, RSCI.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов, списка литературы (174 источника), 2 приложений. Работа иллюстрирована 49 рисунками и 10 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Анализ отечественной и зарубежной литературы отражен в пяти подглавах. В первой дана подробная характеристика бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, во второй описаны основные классы вторичных метаболитов, в третьей описана структурно-функциональная организация геномов родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, в четвертой дана характеристика генов с плейотропным эффектом, в заключительной пятой главе описано практическое применение бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* в сельском хозяйстве.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом исследования служили аэробные спорообразующие почвенные бактерии с разнообразным спектром биологической активности: пробиотики для животных (*Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, *B. subtilis* KATMIRA 1933), фитостимулятор (*B. atrophaeus* AG-8), пробиотик для рыб (*B. amyloliquefaciens/velezensis* R5), штаммы с противогрибковой активностью в отношении *Candida albicans* (*B. subtilis* C65A, C65B, *Bacillus* spp. C15, C49.1A, C76.2) и *Fusarium* spp. (*Paenibacillus polymyxa* V3.14, O1.27, *P. peoriae* R5.31), а также биодеградаторы микотоксинов (*B. licheniformis* CL33, CL35, *B. safensis* CL56).

В штамме *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 с использованием системы CRISPR-Cas была проведена направленная делеция гена глобального регулятора *abrB*. Полученные 12 делеционных мутантов *B. amyloliquefaciens* B-1895, созданных в рамках совместного проекта, любезно предоставлены Е. Ю. Гнучих.

В качестве биосенсоров применяли рекомбинантные штаммы *E. coli* MG1655, несущие плазмиды с *lux*-опероном *Photobacterium luminescens*, транскрипционно слитым с промоторами генов *recA* (pRecA-*lux* — детекция повреждений ДНК и индукции SOS-ответа) и *katG* (pKatG-*lux* — детекция окислительного стресса) (Chistyakov V. A. et al., 2018; Zavilgelsky G. B. et al., 2007).

Культивирование бактериальных и грибных культур проводили на средах LB (стандартной и с добавлением глюкозы, пектина, крахмала и/или рифампицина для оценки экспрессии и отбора мутантов), агаре Сабуро (грибы), а также на жидкой среде LB с ампициллином (биосенсоры) и с зеараленоном (ИФА).

Микробиологические методы. Для анализа экспрессии штаммы культивировали при 37 °C в течение 3 суток на средах различного состава. Rif-устойчивые мутанты получали методом спонтанного мутагенеза на среде с рифампицином (0,01 мг/мл). Антагонистическую активность бацилл в отношении *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* spp. определяли методом совместного культивирования по ширине зоны подавления роста грибов. Генетическую стабильность мутантов оценивали повторным тестированием антагонистической активности после 10 пассажей.

Биосенсорный тест. ДНК-защитную и антиоксидантную активность оценивали с использованием штамма *E. coli* MG1655 (pRecA-*lux*). В качестве индукторов применяли ципрофлоксацин (10^{-4} мг/мл, ингибитор ДНК-гиразы, индуктор SOS-ответа), диоксидин ($2 \cdot 10^{-5}$ мг/мл, повреждение ДНК) и перекись водорода (10^{-3} мг/мл, окислительный стресс) (Campoli-Richards D. M. et al., 1988; Fadeeva N. I. et al., 1980). Бесклеточные препараты получали центрифугированием и фильтрацией культур. Биолюминесценцию регистрировали каждые 10 мин в течение 120 мин (FLUOstar Omega, BMG Labtech). Коэффициент индукции рассчитывали как $I_s = (I_e/I_k) - 1$, протекторный эффект — как $P = (1 - I_p/I_a) \cdot 100 \%$, где I_k ,

Le — люминесценция контрольного и опытного образцов, Ip, Ia — индукция в присутствии протектора и в контроле. Опыты выполняли в трёх повторностях с оценкой значимости по t-критерию Стьюдента ($P = 0,05$). Данная методика была ранее отработана и апробирована на метаболитах известных пробиотических штаммов энтеробактерий (Kulikov et al, 2022).

Молекулярно-генетические методы. Тотальную РНК выделяли набором «ExtractRNA» (Евроген) из культур, выращенных в течение трёх суток, с последующим контролем концентрации (FLUOstar Omega). Одноцепочечную кДНК синтезировали на РНК-матрице с использованием набора «MMLV RT kit» (Евроген). Праймеры к генам ключевых метаболитов и регуляторов (*srfAA*, *fenC*, *fusA*, *pmxE*, *ituD*, *baeA*, *mlnA*, *dfnA*, *ccpA*, *abrB*, *16S*) подбирали по литературным данным и с помощью программы Oligo 7; оптимальную температуру отжига рассчитывали в калькуляторах Tm Calculator (NEB), Oligo Calc и по уравнению $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ (Borah, 2011). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Scientific) с реагентами qPCRmix-HS SYBR (Евроген). В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Иммуноферментный анализ. Содержание зеараленона определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора ИП1708.1 (Иммунотэкс) при факторе разведения 160. Оптическую плотность измеряли относительно длины волны сравнения 630 нм; относительное поглощение рассчитывали как $A = Bi/Bo \times 100 \%$, концентрацию микотоксина определяли по калибровочной кривой.

Биоинформатическая обработка данных. Геномную ДНК выделяли по методу Gautam A. (2022) и секвенировали на платформе MinION с набором Rapid Barcoding Kit V14 (Oxford Nanopore Technologies). Оценку качества ридов и фильтрацию выполняли в NanoPlot v1.42.0 и Filtlong v0.2.1, сборку геномов — в Flye v2.9.5, оценку полноты и контаминации — в CheckM v1.2.3 и CheckM2 v1.0.2, визуализацию структуры хромосом — в Bandage v0.9.0. Таксономическую идентификацию и филогенетический анализ проводили по средней нуклеотидной идентичности (ANI) с использованием GTDB-Tk v4.2.0 (протоколы *classify_wf* и *de_novo_wf* по 120 маркерам); визуализацию мутаций в генах *abrB* и *rpoB* — в Unipro UGENE 53.1.

Статистическая обработка. Данные обрабатывали в Microsoft Excel; все эксперименты выполняли в трёх независимых биологических повторностях ($n = 3$). Рассчитывали среднее (M) и 95% доверительный интервал ($ДИ = t(\alpha, df) \times SEM$). Значимость различий оценивали двухвыборочным t-критерием Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$ (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Отбор штаммов *Bacillus* и *Paenibacillus* для исследования. Определение спектра генов НРПС

Для отбора целевых объектов и воздействия на экспрессию генов НРПС и генов-регуляторов проведён скрининг хитов серии С — штаммов с активностью против *Candida albicans*. Для определения спектра вторичных метаболитов выполнено полногеномное секвенирование изолятов; результаты объединены в «Базу данных геномов бактерий-продуцентов биологически активных соединений» (RU 2026620600; 10.02.2026). База содержит систематизированную информацию о 35 штаммах родов *Bacillus* и *Paenibacillus* с указанием их таксономической принадлежности, геномных координат регионов биосинтеза 36 биологически активных соединений и типов биологической активности.

Для дальнейшей работы отобраны: пробиотики для животных — *B. amyloliquefaciens* B1895, *B. subtilis* KATMIRA 1933; фитостимулятор — *B. atrophaeus* AG-8; пробиотик для рыб — *B. amyloliquefaciens/velezensis* R5; противогрибковые штаммы с активностью против *Candida albicans* — *B. subtilis* C65A, C65B, *Bacillus* spp. C15, C49.1A, C76.2; противогрибковые штаммы с активностью против *Fusarium* spp. — *P. polymyxa* V3.14, O1.27, *P. peoriae* R5.31; целлюлозолитики и биodeградаторы микотоксинов — *B. licheniformis* CL33, CL35, *B. safensis* CL56.

3.2. Влияние мутаций в гене устойчивости к рифампицину (*rpoB*) на противогрибковую активность

Ранее установлено, что штаммы *B. subtilis* KATMIRA1933 и *B. amyloliquefaciens* B-1895 обладают ДНК-протекторной и SOS-ингибирующей активностью, причём у мутантов, устойчивых к рифампицину, эта активность значительно выше, чем у контрольных штаммов. Основная гипотеза заключалась в том, что данный эффект могут обеспечивать пептиды рибосомальной и нерибосомальной природы. Мутации в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы, широко известны плеiotропными эффектами, выходящими за рамки устойчивости к антибиотикам, и часто приводят к увеличению продукции вторичных метаболитов, среди которых особый интерес представляют нерибосомальные пептиды.

Антиоксидантную и антимутагенную активность культуральной жидкости в биосенсорном анализе рассматривали как селективный критерий для отбора пробиотиков. Изучены антиоксидантная (биосенсор с конструкцией pKatG-lux), ДНК-защитная и SOS-ингибирующая (биосенсор с конструкцией pRecA-Lux) активность двух штаммов и их Rif^R-мутантов (рис. 1).

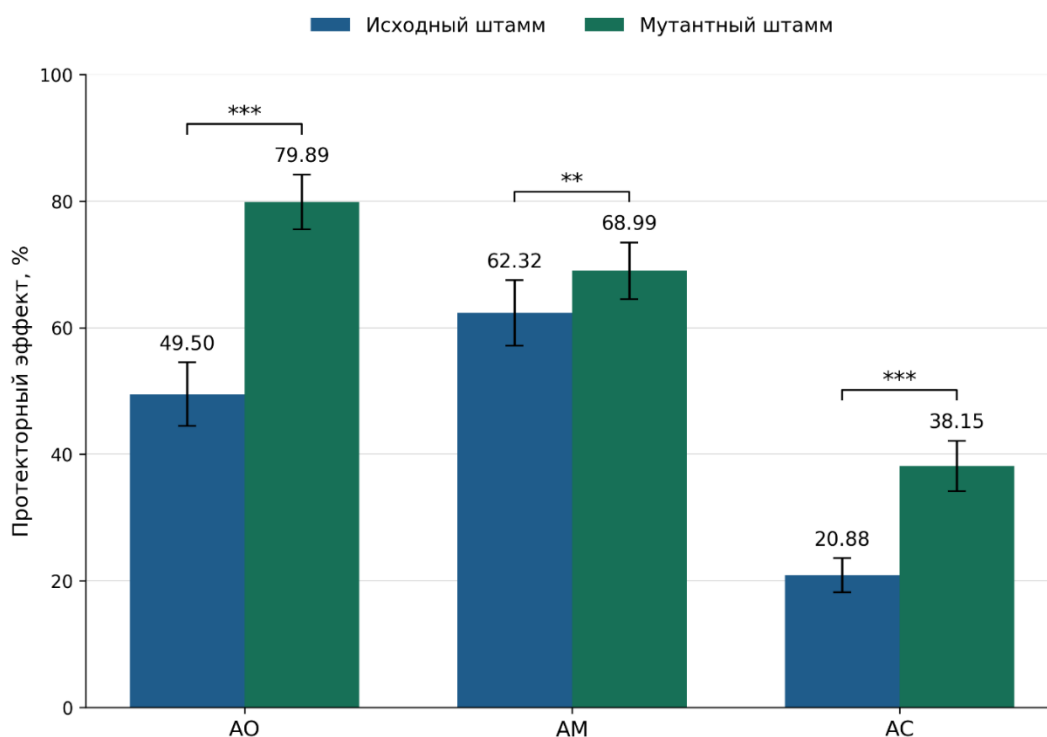


Рисунок 1. Протекторная активность исходного штамма *B. subtilis* KATMIRA1933 (1) и мутанта Rif^R (2). АО — антиоксидантное действие, АМ — антимутагенное (ДНК-защитное) действие, АС — анти-SOS-свойства. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента).

По всем трём показателям Rif^R-мутант KATMIRA1933 достоверно превосходил исходный штамм, что свидетельствует о системном усилении стрессозащитного потенциала.

Наиболее выраженное увеличение зафиксировано по антиоксидантному показателю: 79,89% против 49,50% ($p < 0,001$). ДНК-защитная активность мутанта (68,99%) превышала исходную (62,32%; $p < 0,01$); анти-SOS-активность возрастала с 20,88% до 38,15% ($p < 0,001$). Полученные данные согласуются с концепцией «рифампицинового эффекта», при котором мутации в *rpoB*, помимо резистентности, обуславливают перестройку глобальной транскрипционной программы клетки и усиленную экспрессию генов стрессового ответа.

Для *B. amyloliquefaciens* B-1895 получены схожие данные: Rif^r-мутант достоверно превосходил исходный штамм по всем трём параметрам (рис.2).

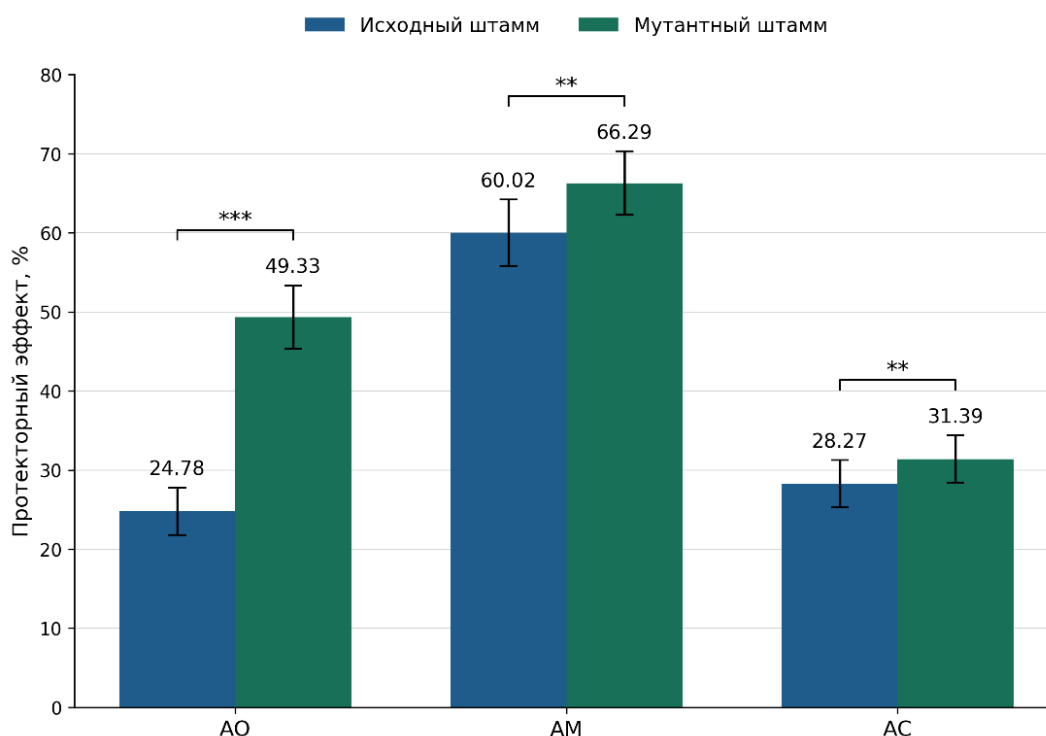


Рисунок 2. Протекторная активность исходного штамма *B. amyloliquefaciens* B-1895 (1) и мутанта Rif^r (2). Обозначения аналогичны Рис. 1.

Антиоксидантный эффект мутанта составил 49,33% против 24,78% ($p < 0,001$) — практически двукратное увеличение; ДНК-защитная активность — 66,29% против 60,02% ($p < 0,01$); анти-SOS-активность — 31,39% против 28,27% ($p < 0,01$). Сопоставление двух видов показывает, что Rif^r-мутации воспроизводимо усиливают все три аспекта протекторной активности вне зависимости от видовой принадлежности, тогда как штаммоспецифичность проявляется прежде всего в различии базовых уровней. Это подтверждает перспективность Rif^r-селекции как инструмента направленного улучшения стрессозащитных свойств штаммов-продуцентов.

Далее рассмотрено влияние мутаций *rpoB* на выработку метаболитов с противогрибковыми свойствами. Отобраны топ-5 штаммов с активностью против грибов рода *Candida*; противогрибковую активность измеряли как в обычных условиях, так и на среде с добавлением лизата *C. albicans*. Штаммы C49.1A и C76.2 показали наибольший уровень индукции при культивировании на лизате *C. albicans*; C65A проявлял наибольший антагонистический эффект в индуцированном и неиндуцированном состоянии.

Протестировано 5 контрольных и 15 мутантных штаммов на способность подавлять рост гриба рода *Fusarium* методом совместного культивирования. У штамма C15 наиболее перспективны мутанты Rif^r 2 (зона подавления 10 мм) и Rif^r 4 (11 мм) против 8 мм у контроля. У C49.1A изменений активности не обнаружено (зоны 5 мм у всех вариантов), что свидетельствует об отсутствии перестройки регуляторных механизмов биосинтеза. У C65A Rif^r-мутанты, напротив, показали меньшие зоны (5 мм против 7 мм у контроля), что указывает на негативное плейотропное воздействие. У C65B наиболее перспективен мутант Rif^r1 (7 мм против 4 мм у контроля). Наиболее примечателен штамм C76.2 (рис.3): у обоих мутантов зафиксировано появление антагонистической активности *de novo* (6 и 8 мм) при её отсутствии у родительского штамма, что свидетельствует о принципиальной возможности активации скрытого противогрибкового потенциала посредством направленного мутагенеза.

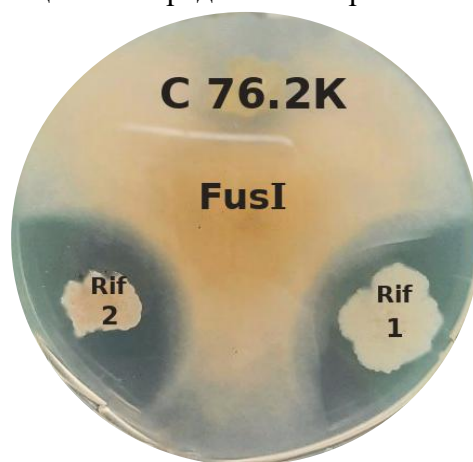


Рисунок 3. Зоны подавления *Fusarium* штаммом C76.2 (К – контроль, Rif1 – мутант 1, Rif2 – мутант 2).

Rif-устойчивые мутанты C76.2 подвергнуты серийному пересеву (10 последовательных пассажей). По завершении оценена их активность в отношении *Alternaria* sp. и *Cladosporium* sp. Оба мутанта подавляли рост *Alternaria* (5 мм); в отношении *Cladosporium* мутант C76.2 Rif2 проявил более выраженную активность (7 мм против 4 мм у Rif1) (рис. 4).

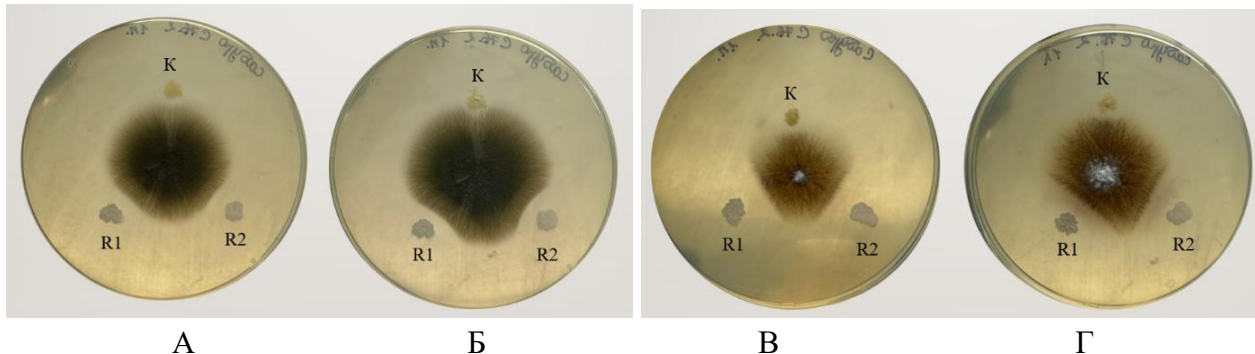


Рисунок 4. Зоны подавления *Cladosporium* (А,Б) и *Alternaria* (В, Г) штаммом C 76.2. А, В – 1 пассаж, Б, Г – 10 пассаж

Десятикратный пассаж не привёл к снижению активности, что свидетельствует о стабильности приобретённого свойства и перспективности штамма как стабильного продуцента.

Получены также Rif^r-мутанты штаммов CL33, CL35, CL56 (пробиотики для крупного рогатого скота, отобранные в предыдущих работах как деградаторы микотоксинов в кормах (Bren et al, 2023)). Штаммы оценены на анти-кворум (quorum-quenching) активность, в данном случае - способность подавлять биолюминесценцию *A. logei* (рис.5). Известно, что данная

активность может коррелировать с деградацией микотоксинов за счет общих ферментов (Statsenko et al, 2026).

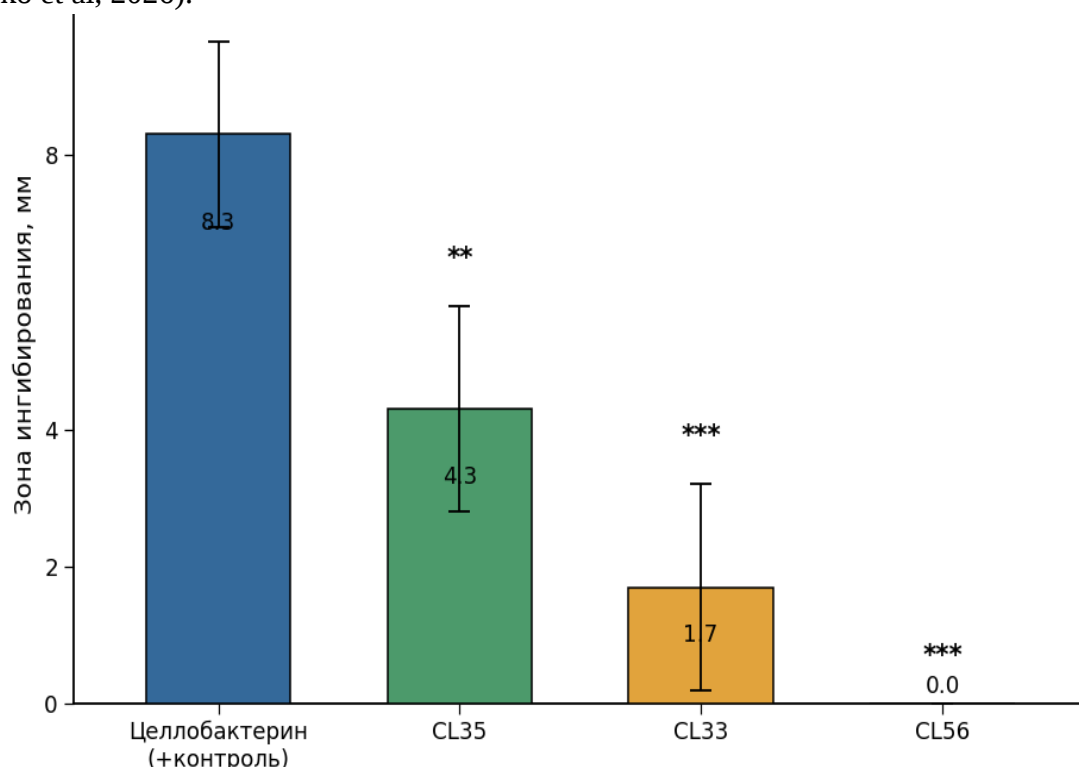


Рисунок 5. Зоны ингибирования биолуминесценции *A. logei* 12146. $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, сравнение с контролем (Целлобактерин)).

Наибольшую ингибирующую активность показал CL35; степень снижения нарастала от CL35 к CL56, у которого подавляющий эффект полностью отсутствовал. Выявленные различия указывают на штамм-специфический характер активности и позволяют рассматривать CL35 как наиболее перспективный изолят группы.

Полногеномное секвенирование идентифицировало CL33 и CL56 как *B. licheniformis*, CL35 — как *B. safensis*. Показано, что ген *cotA* (лакказы) присутствовал во всех трёх штаммах со 100% идентичностью известным лакказам *Bacillus*; также присутствовал ген *BsaPUE*, частично гомологичный фосфоенолпируват-протеинфосфотрансферазам видов *Bacillus*.

Иммуноферментный анализ подтвердил способность штаммов снижать концентрацию зеараленона (табл.1).

Таблица 1 – результаты ИФА

Штамм	Концентрация зеараленона, мкг/мл
Чистый микотоксин 8,1 мкг/кг	0,544±0,073
CL33	0,073±0,023
CL35	0
CL56	0,306±0,028
CL33 Rif	0,289±0,033
CL35 Rif	0,108±0,040
CL56 Rif	0,307±0,064

При исходной концентрации 0,544 мкг/мл внесение CL33 снижало её до 0,073 мкг/мл (приблизительно семикратно), а у CL35 концентрация опускалась ниже предела обнаружения метода; CL56 проявлял минимальную активность (0,306 мкг/мл).

Таким образом, у Rif-устойчивых мутантов эффективность деградации была ниже, чем у исходных. Для исходных штаммов при этом прослеживается взаимосвязь между деградацией зеараленона и QQ-активностью: CL35 лидировал по обоим показателям, тогда как CL56, не проявлявший QQ-активности, характеризовался наименьшей деградирующей способностью. Вероятным молекулярным основанием связи служит ген *cotA*, кодирующий лакказу с широкой субстратной специфичностью, способную окислять как фенольные компоненты сигнальных молекул QS, так и микотоксины с хиноидной структурой, к которым относится зеараленон.

Таким образом, результаты показывают, что механизм деградации микотоксинов штаммами *Bacillus* не входит в число положительно регулируемых геном *rpoB*.

3.3. Полногеномное секвенирование и изучение спектра мутаций штамма C76.2 Rif⁺ в сравнении с исходным штаммом

В сборке генома обнаружены два контига, содержащих последовательности, аннотированные как ген *rpoB*. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей исходного штамма и Rif-резистентного мутанта (Unipro UGENE 53.1) выявил в первой последовательности 13 точечных замен, распределённых по всей длине анализируемого фрагмента (рис.6)

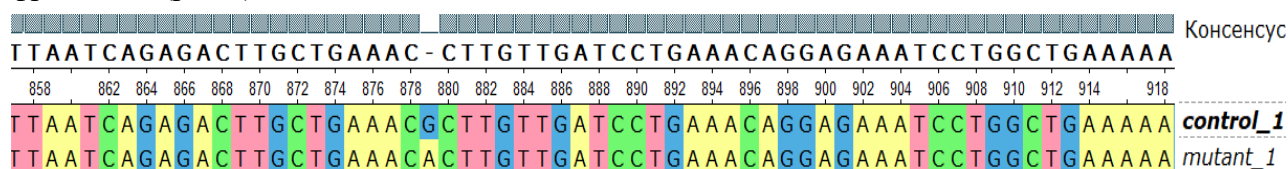


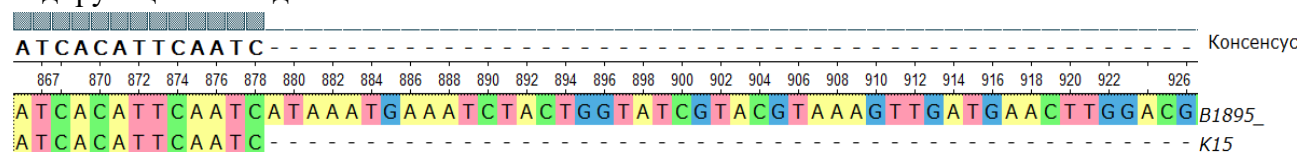
Рисунок 6. Замена G→A в 879 положении в геноме мутанта Rif¹

Большинство замен — транзиции (G→A, C→T, T→C); три замены относятся к трансверсиям (C→A, T→G). Кластеризация замен в области позиций 2016–2019 (три замены в пределах четырёх нуклеотидов) представляет особый интерес и может свидетельствовать о локальной нестабильности участка.

Во второй последовательности выявлено 18 замен (14 транзиций, 4 трансверсии), причём 8 из них сосредоточены в области позиций 1461–1773, где локализованы кластерные районы I и II гена *rpoB*, мутации в которых наиболее часто ассоциированы с устойчивостью к рифампицину у представителей рода *Bacillus*. Характер выявленных замен согласуется с известным механизмом устойчивости: замены в кластерных районах нарушают контакт РНК-полимеразы с рифампицином, не затрагивая каталитическую активность фермента.

3.4. Полногеномное секвенирование и сравнение *B. amyloliquefaciens* B-1895 и делеционного мутанта K15

Визуализация результатов секвенирования (Unipro UGENE 53.1) подтвердила делецию в гене *abrB* штамма K15 (рис.7): при выравнивании с референсным штаммом B1895 установлено отсутствие участка длиной 285 п.н. (позиции 879–1163), что составляет значительную часть кодирующей последовательности гена.



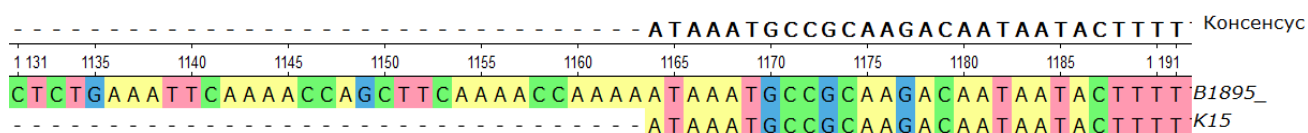


Рисунок 7. Выравнивание нуклеотидных последовательностей исходного штамма B1895 и мутанта K15. Делеция в последовательности B1895 относительно K15 обозначена пропусками.

Данная делеция нарушает синтез функционального белка AbrB — глобального регулятора транскрипции, контролирующего экспрессию генов споруляции, биосинтеза антибиотиков и биоплёнокообразования, и таким образом влияет на регуляцию соответствующих фенотипических признаков у штамма K15.

3.5. Изучение свойств штаммов, мутантных по *abrB*

Были изучены свойства штаммов, делеционных по *abrB* гену. Поскольку белок AbrB выступает репрессором генов, связанных с продукцией вторичных метаболитов, его инактивацию рассматривали как способ повышения биосинтетического потенциала штамма. Полученные мутантные клоны продемонстрировали клон-специфичный характер изменений: у части из них усиливалась антиоксидантная, ДНК-защитная и SOS-ингибирующая активность, тогда как у других выраженного эффекта не наблюдалось.

Антиоксидантная активность исходного штамма B-1895 составила 71,6% (рис.8). Наиболее выраженным усилением антиоксидантного потенциала характеризовались клоны K14, K15 и K26 (90,9%, 91,9% и 90,7%; превышение контроля на 19–20%). Принципиально иная картина наблюдалась у клонов K27, K49 и K50 (50,9%, 49,6% и 44,8%; снижение на 21–27%).

Таким образом, можно утверждать, что делеция гена *abrB*, произведенная данным методом, приводит к разнонаправленным изменениям антиоксидантного потенциала, вероятно, связанным с внецелевыми (off-target) эффектами CRISPR-Cas.

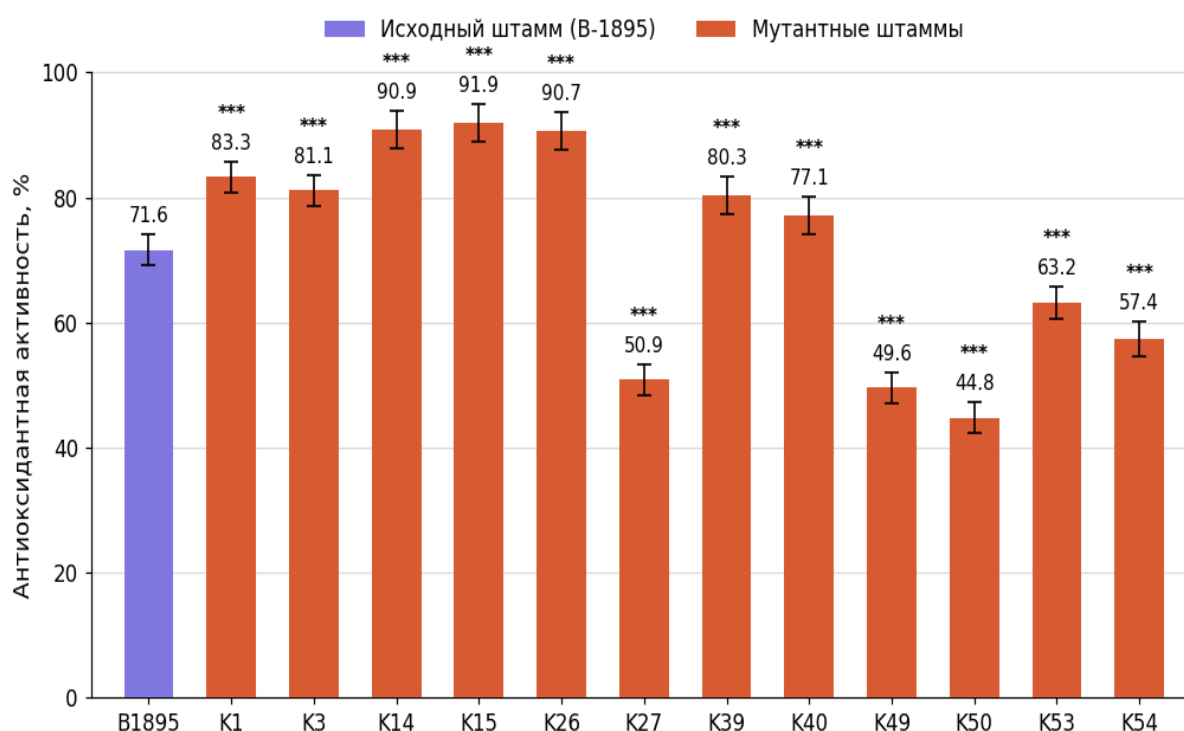


Рисунок 8. Сравнение антиоксидантного эффекта у мутантов *B. amyloliquefaciens* В-1895 с контрольным штаммом (индуктор — пероксид водорода). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении с исходным штаммом).

Способность исходного штамма к подавлению SOS-ответа составила 60,3% (рис.9).

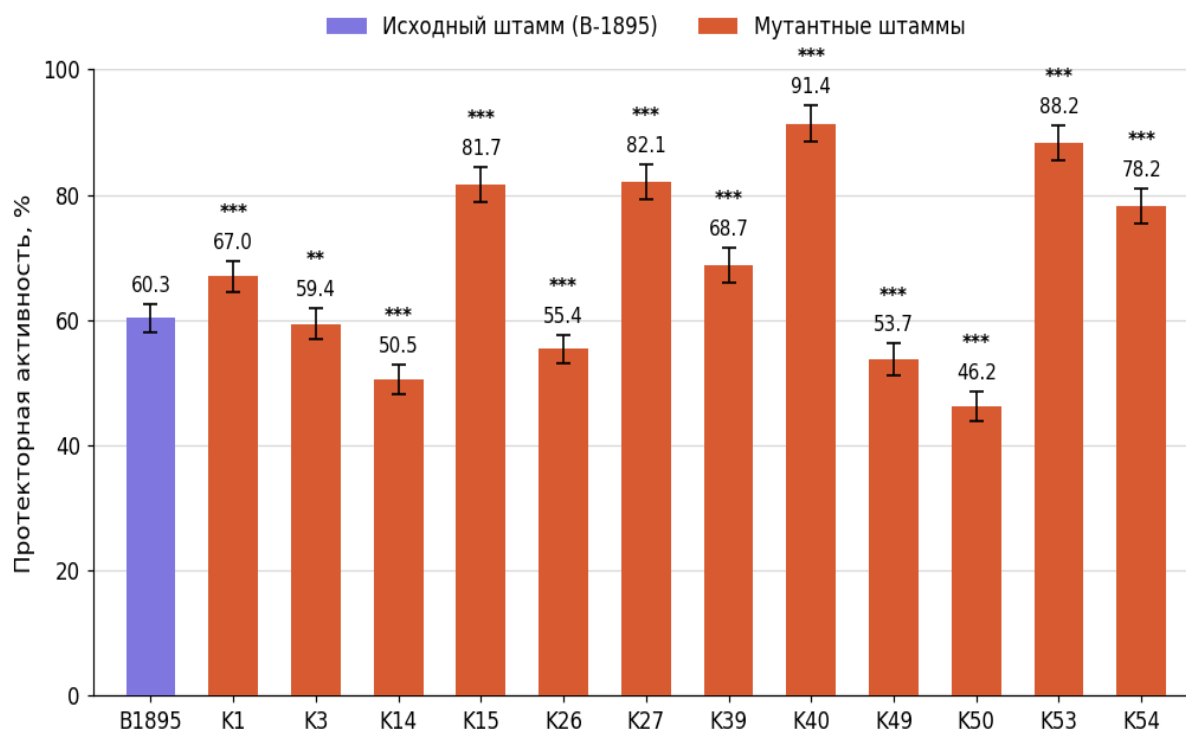


Рисунок 9. Сравнение способности подавления SOS-ответа у мутантов *B. amyloliquefaciens* В-1895 с контрольным штаммом (индуктор — ципрофлоксацин). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении с исходным штаммом).

Наиболее высокую активность демонстрировали штаммы K40 и K53 (91,4% и 88,2%). Примечательно, что штаммы K40 и K27 при высокой анти-SOS-активности характеризовались лишь умеренной или сниженной антиоксидантной активностью, что указывает на изменения в генах, специфически регулирующих ответ на повреждения ДНК. Характер распределения штаммов по группам принципиально отличался от наблюдавшегося при оценке антиоксидантной активности, что свидетельствует о независимости соответствующих механизмов.

ДНК-протекторная активность контрольного штамма составила 52,1%; диапазон значений мутантов оказался наиболее широким (от 40,8% у K50 до 89,3% у K40). Лидирующие позиции занимали штаммы K40 (89,3%), K49 (82,3%) и K54 (80,1%)(рис.10).

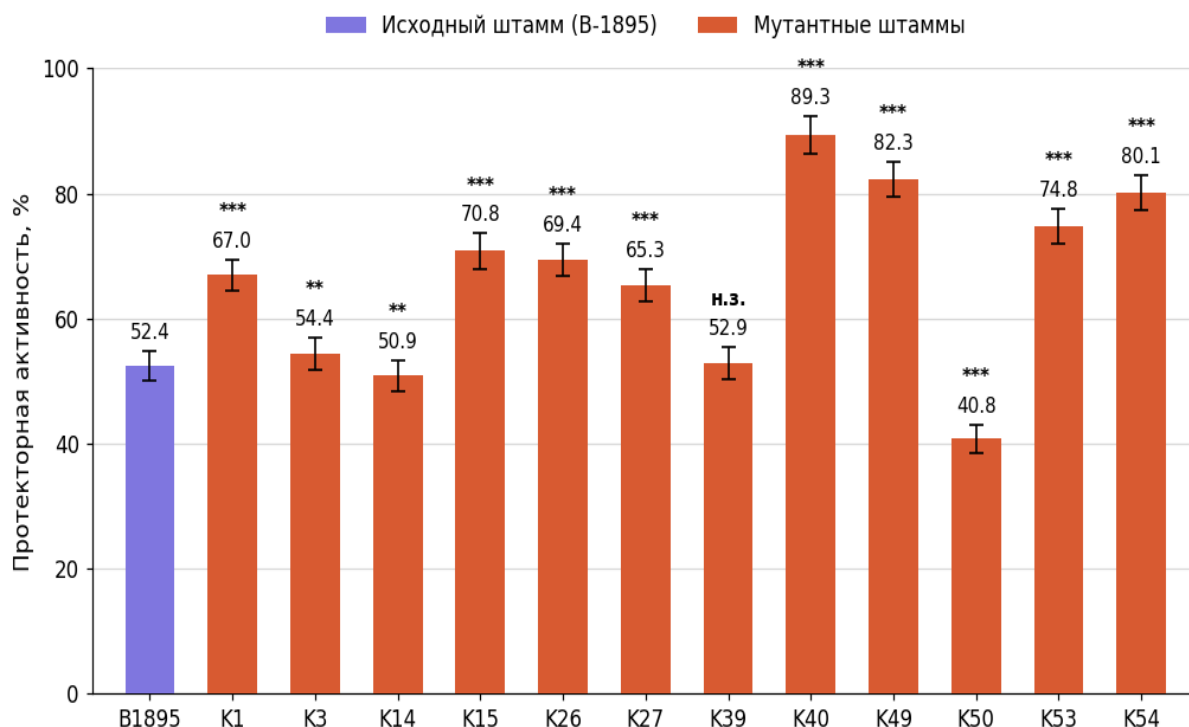


Рисунок 10. Сравнение ДНК-протекторной активности мутантов *B. amyloliquefaciens* B-1895 с контрольным штаммом (индуктор — диоксидин). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении с исходным штаммом).

Штамм K40 устойчиво демонстрировал высокие показатели во всех трёх системах, что делает его приоритетным кандидатом для углублённого молекулярно-генетического анализа; K15 также проявлял стабильно повышенную активность, тогда как K50 последовательно занимал нижние позиции.

Таким образом, полная или частичная инактивация *abrB* способствует увеличению синтеза вторичных метаболитов с протекторной активностью, однако эффект является штамм-и клон-специфичным. После редактирования в области *abrB* сохранились 23 нефункциональных нуклеотида, включая терминатор, в связи с чем итоговый фенотип определялся не только самой делецией, но и особенностями остаточной регуляторной структуры. Это указывает на сложный характер регуляции, при котором потеря функции *abrB* не всегда приводит к одинаковому биохимическому ответу.

3.6. Дифференциальная экспрессия генов *sspA* и *abrB* на разных питательных средах

Ранее установлено, что у штаммов *Bacillus* и *Paenibacillus* замена глюкозы крахмалом стимулирует относительную экспрессию *PmxE* за счёт работы генов-регуляторов. Поэтому была проведена оценка экспрессии генов метаболизма углевода на средах с различными источниками углерода (глюкоза, крахмал, пектин).

3.6.1. Фитостимулятор *Bacillus atrophaeus* AG-8.

При опытах со штаммом *Bacillus atrophaeus* AG-8 ген *sspA* демонстрировал снижение транскрипции на глюкозе (3,49) и крахмале (1,42) относительно LB (5,03), тогда как пектин вызывал резкую индукцию до 13,84 ($p < 0,001$). Ген *abrB* незначительно повышался на глюкозе

(1,77) и последовательно снижался на крахмале (0,99) и пектине (0,61). Единственным эффективным индуктором *pmxE* являлся пектин (8,21; $p < 0,001$) (рис. 11).

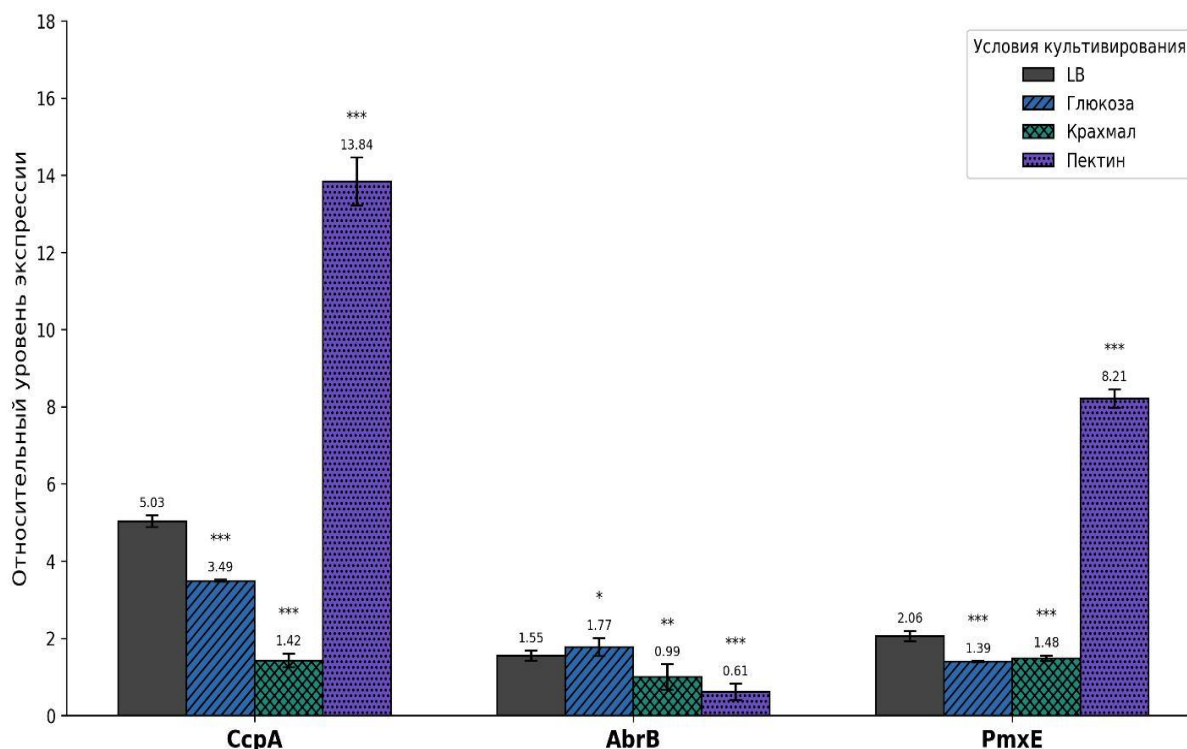


Рисунок 11. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма AG8 относительно *16sBam*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении со стандартной средой LB).

Таким образом, у AG8 пектин формирует оптимальные условия для биосинтеза полимиксина, одновременно активируя *cspA*, подавляя *abrB* и максимально индуцируя *pmxE*.

3.6.2. Пробиотик для рыб *Bacillus amyloliquefaciens/velezensis* R5.

При изучении экспрессии штамма *Bacillus amyloliquefaciens/velezensis* R5 было установлено, что ген *cspA* резко активировался на глюкозе (5,12) и достигал максимума на крахмале (10,87; $p < 0,001$) (рис.12).

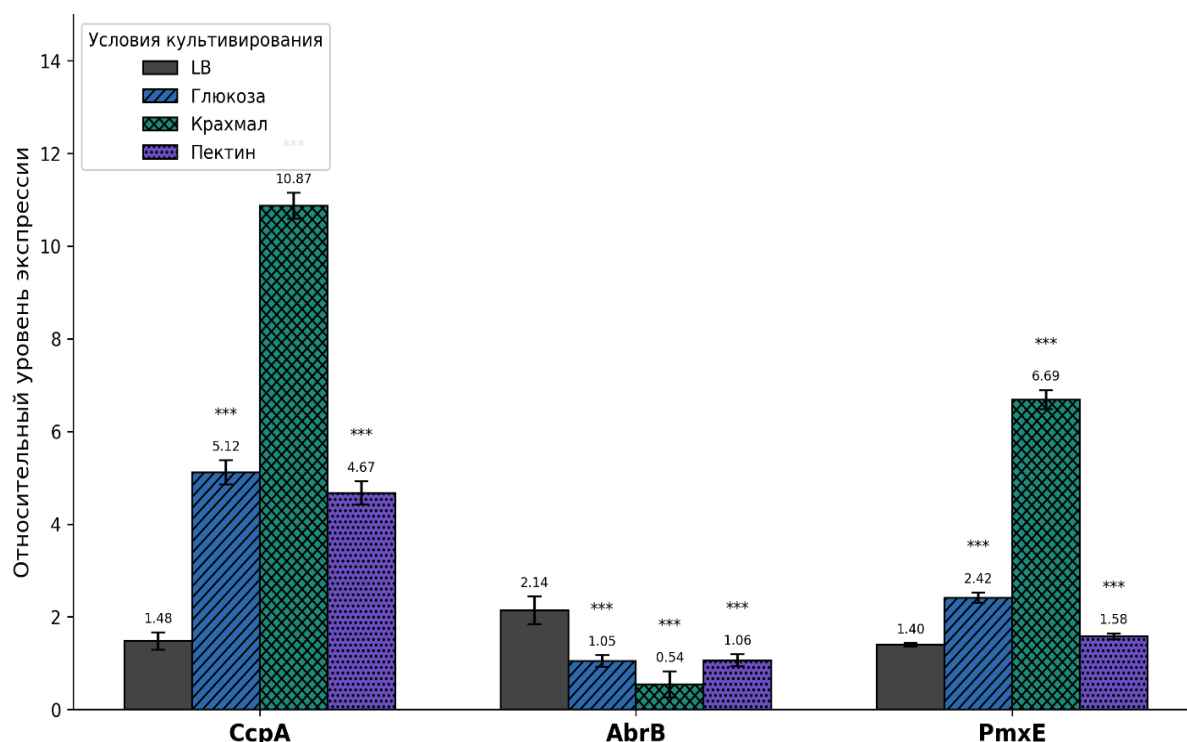


Рисунок 12. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма R5 относительно *16sBam*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении со стандартной средой LB).

Ген *abrB* подавлялся на всех субстратах, наиболее выражено на крахмале (0,54). Максимальная активация *pmxE* наблюдалась на крахмале (6,69; $p < 0,001$); глюкоза давала умеренную индукцию (2,42), пектин практически не влиял (1,58). Таким образом, можно заключить, что для штамма R5 ключевым индуктором биосинтеза полимиксина выступает крахмал.

3.6.3. Противогрибковые штаммы с активностью против *Fusarium spp.*

Из всех противогрибковых штаммов *P. polymyxa* V 3.14 демонстрирует наиболее выраженную субстратную специфичность: крахмал — единственный источник, индуцирующий *cspA* (7,08) и *pmxE* (8,48 — максимальное значение среди всех штаммов; $p < 0,001$), тогда как глюкоза и пектин подавляют оба гена (рис.13). На пектине *abrB* статистически неотличим от LB при одновременном подавлении им *cspA* и *pmxE*, что свидетельствует о разобщённости регуляторных путей в данных условиях.

У штамма *P. polymyxa* O1.27 оба полисахаридных субстрата вызывали сопоставимую индукцию *cspA* (10,84 на крахмале; 9,71 на пектине). Ген *abrB* подавлялся на всех альтернативных источниках. В отличие от прочих штаммов, уже глюкоза достоверно индуцировала *pmxE* (2,52); на крахмале и пектине — 6,64 и 7,58 соответственно. O1.27 характеризуется наиболее широким спектром субстратов, индуцирующих биосинтез полимиксина. У штамма *P. peoriae* R5.31 оба полисахарида обеспечивали выраженную индукцию *cspA* (9,39 на крахмале; 13,98 на пектине). Ген *abrB* умеренно повышался на глюкозе (1,81) и симметрично подавлялся на полисахаридах. Ген *pmxE* подавлялся на глюкозе (1,40), что согласуется с катаболитной репрессией, и индуцировался на крахмале (7,46) и пектине (8,23; $p < 0,001$).

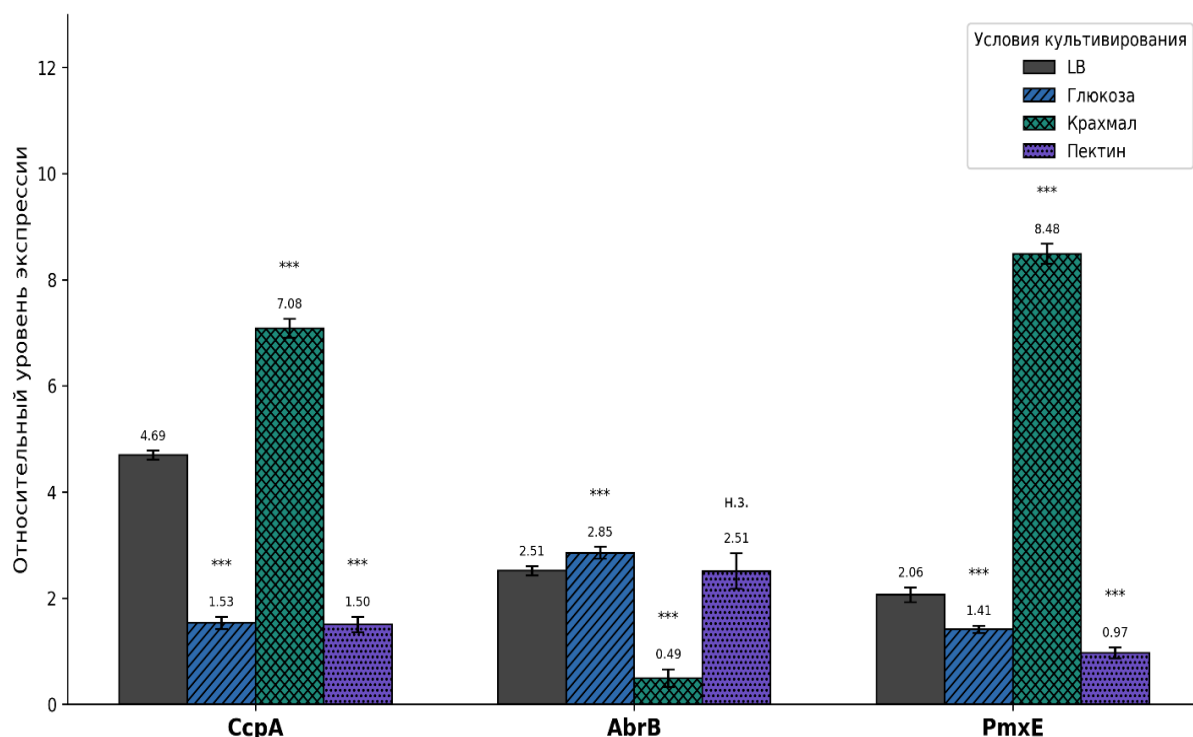


Рисунок 13. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма V 3.14 относительно *16sBam*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении со стандартной средой LB).

3.6.4. Противогрибковые штаммы с активностью против *Candida albicans*.

У штамма *B. subtilis* C65A на глюкозе оба регулятора одновременно повышали транскрипцию (*cspA* 2,68; *abrB* 3,09), что закономерно сопровождалось подавлением *pmxE* (1,37) и подтверждает связь между повышенным уровнем *AbrB* и репрессией биосинтеза полимиксина (рис. 14).

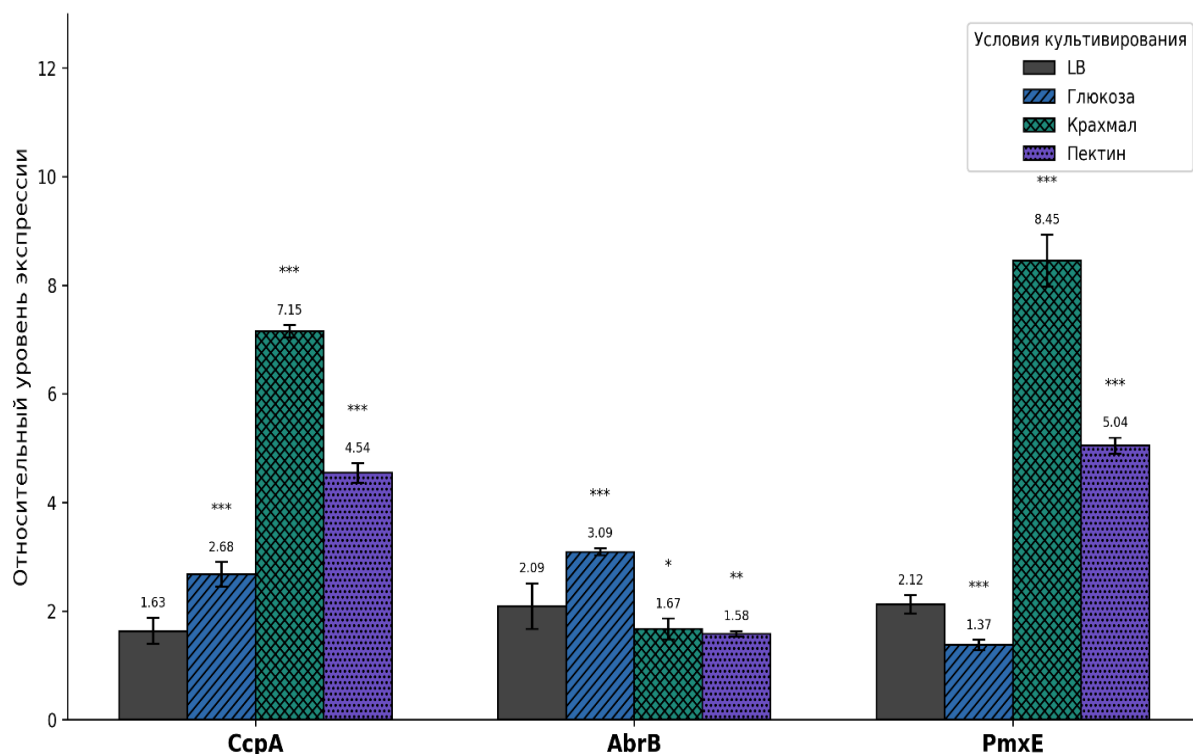


Рисунок 14. Динамика экспрессии генов *PtxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма С65А относительно *16sBam*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении со стандартной средой LB).

На полисахаридах восстанавливалась взаимосвязь регуляторов: *cspA* возрастал (7,15 на крахмале; 4,54 на пектине), *abrB* снижался. Ген *ptxE* на крахмале достигал 8,45 — одного из наиболее высоких значений в группе. Крахмал является предпочтительным субстратом для увеличения транскрипции *ptxE*.

Характерной особенностью штамма *B. subtilis* С65В (рис.15) является наибольший среди всех штаммов базовый уровень *abrB* в LB (4,12), свидетельствующий об усиленном подавлении программ биосинтеза вторичных метаболитов в условиях активного роста. На полисахаридах *abrB* эффективно подавлялся (более чем в 2,5 раза). Ген *cspA* последовательно активировался (7,15 на крахмале; 5,54 на пектине). Ген *ptxE* подавлялся на глюкозе (1,37) и индуцировался на крахмале (8,48) и пектине (7,01). Крахмал оптимален для максимизации транскрипции *ptxE*, пектин служит эффективной альтернативой.

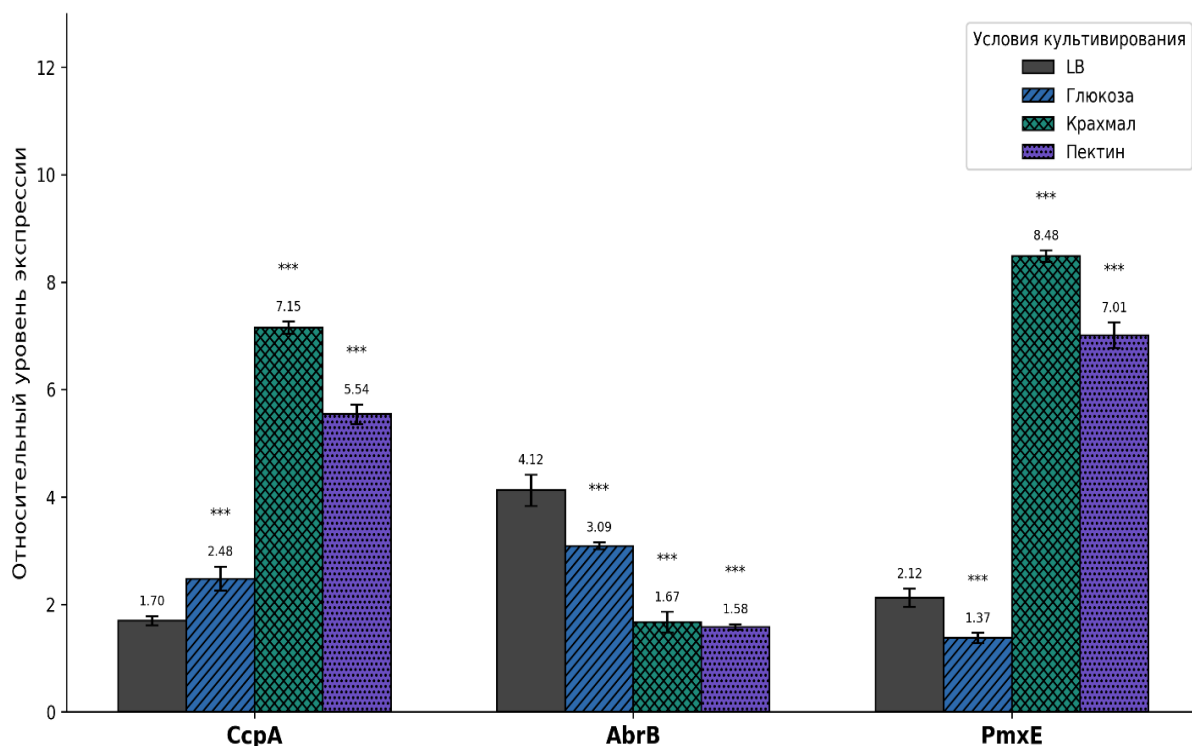


Рисунок 15. Динамика экспрессии генов *PtxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма С65В относительно *16sBam*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении со стандартной средой LB).

Штамм *Bacillus* spp. С15 демонстрировал наиболее сложный профиль с диссоциацией между активацией регуляторных генов и транскрипцией *ptxE*. Ген *cspA* активировался при всех субстратах (максимум на крахмале — 7,74), *abrB* подавлялся. Крахмал обеспечивал выраженную индукцию *ptxE* (6,63), глюкоза — умеренную (2,28), однако пектин, несмотря на активацию *cspA* и подавление *abrB*, достоверно ингибировал *ptxE* (1,31; $p < 0,01$). Крахмал является оптимальным источником, тогда как использование пектина нецелесообразно ввиду парадоксального подавления *ptxE*, что указывает на дополнительный уровень регуляции.

Штамм *Bacillus* spp. С.49.1А (рис.16) демонстрирует наиболее выраженную моносубстратную специфичность: крахмал — единственный источник, обеспечивающий

координированную активацию каскада (*сспА* 8,08; *abrB* снижался до 0,66; *pmxE* 8,55), тогда как глюкоза и пектин подавляли все ключевые гены. Крахмал является оптимальным источником углерода для увеличения биосинтеза полимиксина.

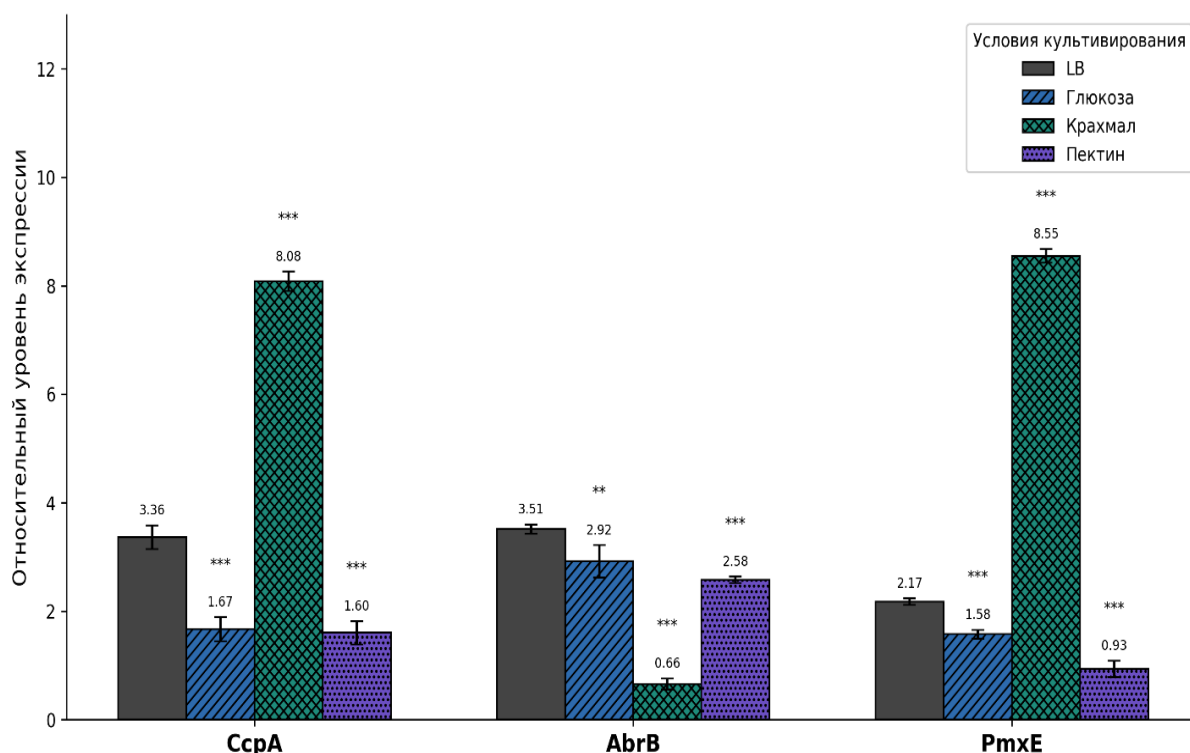


Рисунок 16. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма С.49.1А относительно *16sBam*. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, в сравнении со стандартной средой LB).

У штамма *Bacillus* spp. С 76.2 ген *сспА* возрастал по мере увеличения молекулярной сложности субстрата (от 2,86 в LB до 10,72 на пектине), *abrB* обнаруживал противоположную тенденцию (до 0,78 на пектине). Ген *pmxE* подавлялся на глюкозе (1,39) и возрастал на крахмале и пектине (6,45 и 7,31).

Таким образом, можно заключить, что источник углерода является одним из ключевых факторов уровня экспрессии исследуемых генов. В присутствии глюкозы, как правило, наблюдается снижение экспрессии целевых генов синтеза НРП, связанное с катаболитной репрессией; на средах с крахмалом и пектином отмечается более высокая или сопоставимая экспрессия. Повышение *сспА* отражает участие глобальной регуляции углеводного обмена в адаптации клеток к альтернативным источникам углерода, тогда как снижение *abrB* сопровождается ослаблением репрессивного контроля и создаёт условия для активации биосинтетического пути. Выявленная штаммоспецифичность подчёркивает необходимость индивидуального подбора состава питательной среды для каждого продуцента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что мутации в гене *groB*, приводящие к рифампицин-резистентности (RifR), существенно усиливают протекторную и противогрибковую активность штаммов. Увеличение активности у рифампицин-резистентных штаммов косвенно свидетельствует о гиперпродукции вторичных метаболитов, гены синтеза которых обнаружены в геномах изученных штаммов. Можно допустить, что мутации *groB* активируют соответствующие биосинтетические генные

кластеры, усиливая синтез этих метаболитов у Rif^R-мутантов, однако это требует прямого экспериментального подтверждения. Полученные результаты подчеркивают перспективность Rif^R-мутантов для разработки биопрепаратов с антимутагенным потенциалом. Также Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* являются перспективной основой для получения постбиотических препаратов с улучшенными противогрибковыми и протекторными свойствами, не требующих прохождения процедуры сертификации ГМО.

Ген *abrB* играет ключевую роль как глобальный регулятор, который в норме сдерживает преждевременную активацию вторичного метаболизма, споруляции и ряда адаптивных процессов у *Bacillus*. Его инактивация или ослабление функции снимает часть репрессии с биосинтетических путей, что может приводить к усилению протекторной, антимутагенной и противогрибковой активности за счет повышения продукции вторичных метаболитов. Поэтому его удаление или нарушение работы не просто меняет один отдельный признак, а перестраивает всю регуляторную сеть клетки, влияя на баланс между ростом, споруляцией и синтезом вторичных метаболитов. При этом эффект может быть неодинаковым у разных клонов, потому что итоговый фенотип зависит от степени нарушения гена, остаточных регуляторных элементов и других особенностей штамма.

Полученные данные демонстрируют, что эпигенетическая регуляция синтеза вторичных метаболитов у бактерий тесно связана с углеродным катаболизмом и иерархической сетью транскрипционных факторов. Замена глюкозы на сложные углеводы (крахмал, пектин) снимает ССР, опосредованную СсрА, путем снижения уровня его метаболических активаторов (фруктозо-1,6-бисфосфат, глюкозо-6-фосфат), что активирует альтернативные пути утилизации углерода, индуцирует экспрессию генов деградации и стимулирует продукцию метаболитов, в частности полимиксина. Также в данном контексте *abrB* следует рассматривать как важный глобальный репрессор, который ограничивает переход бактерий к синтезу вторичных метаболитов. Когда его активность снижается, снимается блокировка с биосинтетических путей, и клетка легче переключается на образование биоактивных соединений. Активность *abrB* можно косвенно подавлять не только генетически, но и за счёт изменения состава питательной среды. При замене глюкозы на другие источники углерода и при изменении соотношения питательных компонентов клетка перестраивает регуляторные сети, и это может снижать экспрессию *abrB*, тем самым ослабляя его репрессорное действие.

По-видимому, наиболее перспективным подходом к получению штаммов — высокоэффективных продуцентов вторичных метаболитов — является одновременное воздействие на генетическом и метаболическом уровнях. Генетические изменения, в частности мутации в регуляторных генах, потенциально позволяют напрямую перестраивать биосинтетические и регуляторные сети, тогда как варьирование условий культивирования способно дополнительно способствовать активации нужных путей за счёт перестройки клеточного метаболизма и снижения репрессии. Можно предположить, что сочетание этих двух подходов будет давать более выраженный и устойчивый эффект по сравнению с использованием каждого из них по отдельности, поскольку теоретически это позволяет одновременно снять ограничения на уровне генома и создать благоприятные условия для экспрессии биосинтетических кластеров. В настоящей работе экспрессия на разных питательных средах была изучена только для немутированных штаммов, поэтому вопрос о совместном эффекте генетической модификации и подбора состава среды на Rif^R-мутантах остаётся открытым и представляет интерес для дальнейших исследований. Штаммы с повышенной протекторной и

противогрибковой активностью могут служить основой для разработки биопрепаратов, которые могут быть востребованы в сельском хозяйстве, экологии и медицине. Особенно важно, что сочетание генетической модификации и подбора условий культивирования позволяет целенаправленно получать штаммы с улучшенными свойствами и повышать их прикладную ценность.

ВЫВОДЫ

1. Методом мутагенеза с последующим отбором на селективных средах, содержащих рифампицин, получены рифампицин-резистентные мутанты ряда штаммов. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей выявил в геноме наиболее метаболически активного из мутантов от 13 до 18 точечных замен, преимущественно транзиций, с кластеризацией в области, гомологичной кластерам I и II гена *rpoB* у представителей рода *Bacillus*. Также методом направленного мутагенеза получен делеционный мутант K15 с удалённым участком гена *abrB* (позиции 879–1163 п.н.).

2. RifR-мутанты демонстрировали повышенную протекторную и антиоксидантную активность по сравнению с исходными штаммами. Активность в отношении подавления кворум-сенсинга у RifR-мутантов, напротив, снижалась по сравнению с контрольными вариантами, что свидетельствует о разобщённости регуляции соответствующих метаболических путей.

3. Полногеномное секвенирование штаммов CL33, CL35 и CL56 позволило идентифицировать их видовую принадлежность: CL33 и CL56 отнесены к *B. licheniformis*, CL35 — к *B. safensis*. Во всех трёх геномах обнаружен ген *cotA*, кодирующий лакказу с широкой субстратной специфичностью, тогда как гены *aiiA* и *bsDyP* отсутствовали.

4. Анализ экспрессии генов-регуляторов показал, что инактивация *abrB* снимает репрессию с биосинтетических кластеров, однако итоговый фенотип варьирует между клонами. Замена источника углерода в питательной среде дополнительно снижает активность СсрА-опосредованной катаболитной репрессии, что усиливает продукцию целевых метаболитов.

5. Сравнительный анализ плеiotропных эффектов мутаций в генах *rpoB* и *abrB* показал, что оба гена являются перспективными мишенями для направленной модификации, однако обеспечивают различные фенотипические эффекты. Мутации в *rpoB* преимущественно усиливают протекторную и антиоксидантную активность, тогда как инактивация *abrB* перестраивает баланс между ростом, споруляцией и вторичным метаболизмом. Наиболее перспективным подходом для целенаправленного повышения продукции вторичных метаболитов признана комбинация генетической модификации по генам *rpoB* и *abrB* с оптимизацией состава питательной среды.

Статьи в научных изданиях, входящих в Перечень ВАК

1. Постбиотики: новая группа биопрепаратов / В. А. Чистяков, Е. В. Празднова, Ю. В. Денисенко [и др.] // Живые и биокосные системы. – 2023. – № 46. – DOI 10.18522/2308-9709-2023-46-1. – EDN KWFCWX. – URL: <https://jbks.ru/archive/issue-46/article-1> (дата обращения 14.07.2026). КЗ

Статьи в научных изданиях, входящих в Scopus, Web of Science, RSCI

2. Antioxidant, DNA-protective, and SOS inhibitory activities of *Enterococcus durans*

metabolites / M. P. Kulikov, V. N. Statsenko, E. V. Prazdnova, S. A. Emelyantsev // Gene Reports. – 2022. – Vol. 27. – P. 101544. – DOI 10.1016/j.genrep.2022.101544. – EDN IKBVP. K3.

3. Statsenko, V. N. Influence of Rifampicin-Resistance Mutations on the Synthesis of Antioxidant, DNA-Protective, and SOS-Inhibitory Metabolites / V. N. Statsenko, E. V. Prazdnova, M. P. Kulikov // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2025. – Vol. 61, No. 3. – P. 542-550. – DOI 10.1134/S0003683824607066. – EDN WEBRMF. K3

4. Functional Genomic Analysis of Three Novel Candidate Probiotic Strains with Quorum-Quenching and Predicted Mycotoxin Mitigation Potential / E. Prazdnova, V. Statsenko, A. Gulyaeva [et al.] // Applied Microbiology. – 2026. – Vol. 6, №. 6. – P. 70. – DOI 10.3390/applmicrobiol6060070. K1.

Патенты/свидетельства

5. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026620600 Российская Федерация. База данных геномов бактерий-продуцентов биологически активных соединений : № 2026620248 : заявл. 04.02.2026 : опубл. 10.02.2026, Бюл. № 2 / Е. В. Празднова, М. П. Куликов, В. Н. Стаценко, А. Б. Брень ; правообладатель федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет».

6. Патент № 2863268 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/00. Плотная питательная среда для культивирования почвенных микроорганизмов : № 2025127351 : заявл. 06.10.2025 : опубл. 01.06.2026, Бюл. № 16 / К. А. Демин, Е. В. Празднова, М. С. Мазанко, М. П. Куликов, В. Н. Стаценко ; патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Южный федеральный университет".

7. Патент № 2864926 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/00. Питательная среда для культивирования почвенных микроорганизмов : № 2025133546 : заявл. 01.12.2025 : опубл. 30.06.2026, Бюл. № 19 / К. А. Демин, Е. В. Празднова, М. П. Куликов, В. Н. Стаценко, М. С. Мазанко ; патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Южный федеральный университет".

Конкурсная поддержка работы

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 25-66-00009, <https://rscf.ru/project/25-66-00009/>, а также программы «Приоритет-2030» в Молодежной лаборатории «Молекулярная генетика микробных консорциумов» и лаборатории «Биотехнологический кластер» Академии биологии и медицины им. Д. И. Иванковского Южного федерального университета (АБИМ ЮФУ), а также при поддержке гранта Российского научного фонда № 25-66-00009, <https://rscf.ru/project/25-66-00009/>.