

**Содержание низкомолекулярных тиолов в клетках *Bacillus subtilis* при росте в условиях азотного голодания****Научный руководитель – Смирнова Галина Васильевна*****Калашникова Татьяна Викторовна****Аспирант*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь,  
Россия*E-mail: tatyana-kalashnikova22@yandex.ru*

Бактерии *Bacillus subtilis* являются типичными представителями почвенной микрофлоры, которые играют ключевую роль в стимуляции роста, улучшении минерального питания растений и борьбе с фитопатогенностью. Однако такие микроорганизмы постоянно подвержены воздействию стрессовых факторов. Одним из механизмов их защиты является поддержание оптимального уровня и редокс-статуса низкомолекулярных тиолов. В настоящий момент изменения уровней тиолов и механизмы их регуляции у бактерий при стрессах недостаточно рассмотрены, поэтому изучение метаболизма тиолов представляется весьма интересным для понимания ответных реакций бактерий на неблагоприятные условия, что может быть использовано для развития промышленности и сельского хозяйства. Исходя из этого, целью настоящей работы было оценить уровень низкомолекулярных тиолов в клетках *B. subtilis* в условиях голода по источнику азота.

Объектом служил штамм *B. subtilis* VKM428 (из коллекции VKM). Бактерии выращивали на минимальной среде M9 с 0.5% глюкозой в течение 20 ч. Ночную культуру разбавляли в 100 мл свежей среды с пониженным содержанием азота (0.5 mM NH<sub>4</sub>Cl) до начальной плотности OD<sub>600</sub> 0.1 и культивировали в колбах на термостатируемом шейкере. Определение тиолов производили методом ВЭЖХ, для этого отбирали 25 мл культуры, клеточный осадок ресуспендировали в 0.5 мл теплого 50% ацетонитрила, содержащего 20 mM Трис-HCl (pH 8) и 2 mM монобромбимана. После 15 мин инкубации при 60 [U+1D52] C в темноте, добавляли 2.5 мкл 5N метансульфонової кислоты, белок и клеточный дебрис осаждали. Перед ВЭЖХ пробу разводили в 4 раза в 10 mM метансульфонової к-те. В качестве элюента А использовали 0.25% уксусную к-ту, pH 3.5; элюент В – метанол. Условия разделения: 0 мин 15% В; 5 мин 15% В; 15 мин 23% В; 45 мин 42% В, с последующей отмывкой 10 мин элюентом В и 10 мин 15% В.

Для идентификации низкомолекулярных тиолов были использованы стандартные растворы соответствующих веществ. Сравнение образцов культуры *B. subtilis*, необработанных и предварительно обработанных тиоловым реагентом NEM, выявило наличие хроматографических пиков, соответствующих цистеину, бациллитиолу и сульфиду. Было обнаружено, что в условиях роста с низким содержанием азота наступление голода наблюдалось в среднем через 150 мин, что характеризовалось резким падением удельной скорости роста культуры до нулевых значений. Голодание по аммонии не приводило к статистически значимому повышению уровня бациллитиола, в то время как содержание цистеина возрастало в 1.3 раза через 30 мин и в 1.5 раза ( $p < 0.05$ ) через 150 мин голодания. Также наблюдалось повышение внутриклеточного сульфида в 1.2 раза ( $p < 0.05$ ). В ряде экспериментов после 90 мин голода в среду был добавлен избыток NH<sub>4</sub>Cl, что способствовало возобновлению роста. В данных условиях происходило повышение уровня BSH в 1.5 раза и одновременное снижение концентрации цистеина и сульфида до начальных уровней, характерных для растущей культуры. Таким образом, было показано, что при недостатке

азота в клетках *B. subtilis* наблюдается обратимое нарушение метаболизма низкомолекулярных тиолов.

*Работа выполнена в рамках госзадания № 124020500028-4.*